(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2007/108559

発行日　平成21年8月6日(2009.8.6)

(43)国際公開日　平成19年9月27日(2007.9.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4H045
A61P 7/00	(2006.01)	A61P	7/00		

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 184 頁）　最終頁に続く

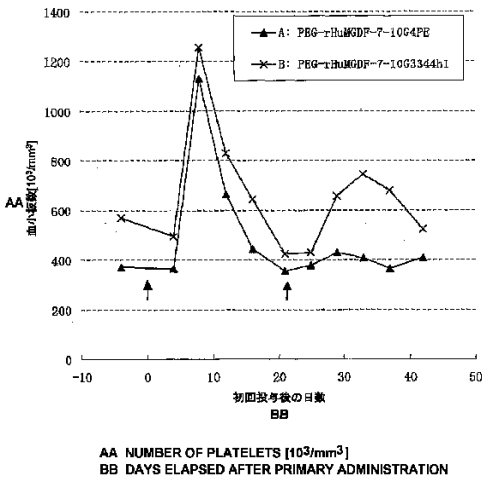
出願番号	特願2008-506356 (P2008-506356)
(21)国際出願番号	PCT/JP2007/056536
(22)国際出願日	平成19年3月20日 (2007.3.20)
(11)特許番号	特許第4294082号 (P4294082)
(45)特許公報発行日	平成21年7月8日 (2009.7.8)
(31)優先権主張番号	特願2006-81322 (P2006-81322)
(32)優先日	平成18年3月23日 (2006.3.23)
(33)優先権主張国	日本国 (JP)
(31)優先権主張番号	特願2006-299554 (P2006-299554)
(32)優先日	平成18年11月2日 (2006.11.2)
(33)優先権主張国	日本国 (JP)

(71)出願人　000001029
協和発酵キリン株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(72)発明者　甲斐　正之
群馬県高崎市宮原町３番地　キリンファーマ株式会社　探索研究所内
(72)発明者　元木　一宏
群馬県高崎市宮原町３番地　キリンファーマ株式会社　探索研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体

(57)【要約】
この発明は、ヒトトロンボポエチン受容体（別名：ヒトｃ－Ｍｐｌ）に対するアゴニスト抗体を提供する。具体的には、抗体の定常領域が、（１）ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、（２）ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは（３）前記（１）又は（２）のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、（ａ）ヒト臍帯血　ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１０，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの５０％以上であり、かつ５０％有効濃度（ＥＣ５０）が１００ｎＭ以下であること、の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体



AA NUMBER OF PLATELETS [$10^3/mm^3$]
BB DAYS ELAPSED AFTER PRIMARY ADMINISTRATION

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体の定常領域が、以下の（１）～（３）：
（１）ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
（２）ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
（３）前記（１）又は（２）のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の（ａ）及び（ｂ）：
（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１０，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのＮ末端がペグ（ＰＥＧ）化された配列番号１のアミノ酸配列からなる下記の構造：
ＰＥＧ－ＮＨ－ＳＰＡＰＰＡＣＤＬＲＶＬＳＫＬＬＲＤＳＨＶＬＨＳＲＬＳＱＣＰＥＶＨ
ＰＬＰＴＰＶＬＬＰＡＶＤＦＳＬＧＥＷＫＴＱＭＥＥＴＫＡＱＤＩＬＧＡＶＴＬＬＬＥＧ
ＶＭＡＡＲＧＱＬＧＰＴＣＬＳＳＬＬＧＱＬＳＧＱＶＲＬＬＬＧＡＬＱＳＬＬＧＴＱＬＰ
ＰＱＧＲＴＴＡＨＫＤＰＮＡＩＦＬＳＦＱＨＬＬＲＧＫＶＲＦＬＭＬＶＧＧＳＴＬＣＶＲ
ＲＡＰＰＴＴＡＶＰＳ－ＣＯＯＨ
を有するＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの５０％以上であり、且つ５０％有効濃度（ＥＣ５０）が１００ｎＭ以下であること、
の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体（ｃ－Ｍｐｌ）に対するアゴニスト抗体。
【請求項２】
以下の（ａ）及び（ｂ）：
（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの７０％以上であり、且つＥＣ５０が１０ｎＭ以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
以下の（ａ）及び（ｂ）：
（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの９０％以上であり、かつＥＣ５０が１ｎＭ以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
以下の（１）～（８）：
（１）配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
（２）配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号５で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
（３）配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
（４）配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
（５）配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号３で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
（６）配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号５で示され

るアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
（７）配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び
（８）配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する、請求項１に記載の抗体。

【請求項５】
ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体。

【請求項６】
重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の（１）及び（２）：
（１）配列番号１０で示されるアミノ酸配列、及び
（２）配列番号１１で示されるアミノ酸配列、
のアミノ酸配列から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のＣ末端側が、ヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列或いは該Ｇ４のアミノ酸配列においてＫａｂａｔ　ＥＵ番号付けにおける２２８位セリンがプロリンに且つ２３５位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、請求項４に記載の抗体。

【請求項７】
以下の（１）～（８）：
（１）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
（２）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
（３）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
（４）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
（５）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
（６）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
（７）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、及び
（８）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
からなる群から選択される、請求項６に記載の抗体。

【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項９】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板増多剤。

【請求項１０】

骨髄移植又は臍帯血移植時の血小板回復促進用である、請求項９に記載の血小板増多剤。
【請求項１１】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤。
【請求項１２】
血小板減少症が、以下の（１）～（６）：
（１）特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、
（２）癌化学療法後の血小板減少症、
（３）再生不良性貧血、
（４）骨髄異形性症候群（ＭＤＳ）、
（５）肝疾患にともなう血小板減少症、及び
（６）骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症、
からなる群から選択される疾患のいずれか１つである、請求項１１に記載の血小板減少症治療剤。
【請求項１３】
以下の（１）～（８）：
（１）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
（２）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
（３）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、及び
（４）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
（５）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
（６）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
（７）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、及び
（８）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
からなる群から選択される、重鎖をコードする塩基配列を含むＤＮＡ及び軽鎖をコードする塩基配列を含むＤＮＡと、それらのＤＮＡの発現を制御する塩基配列を含む１又は複数のＤＮＡとを保持する哺乳動物細胞を作製し、該哺乳動物細胞を培養した培養液から、該重鎖及び軽鎖からなる抗体をコードするＤＮＡの発現産物を単離精製することを含む、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体の製造方法。
【請求項１４】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号２で示されるアミノ酸配列、
（２）配列番号４で示されるアミノ酸配列、
（３）配列番号６で示されるアミノ酸配列、及び
（４）配列番号８で示されるアミノ酸配列、
からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡ。
【請求項１５】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号２で示されるアミノ酸配列、

（２）配列番号４で示されるアミノ酸配列、
（３）配列番号６で示されるアミノ酸配列、及び
（４）配列番号８で示されるアミノ酸配列、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖をコードするＤＮＡ。
【請求項１６】
抗体重鎖のアッパーヒンジ部が、以下の（１）及び（２）：
（１）配列番号１０で示されるアミノ酸配列、及び
（２）配列番号１１で示されるアミノ酸配列、
のアミノ酸配列から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列であり、並びに、該抗体重鎖のミドルヒンジ部以降のＣ末端側が、ヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列或いは該Ｇ４のアミノ酸配列においてＫａｂａｔ　ＥＵ番号付けにおける２２８位セリンがプロリンに且つ２３５位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、請求項１５に記載のＤＮＡ。
【請求項１７】
以下の（１）～（８）：
（１）配列番号３で示されるアミノ酸配列、
（２）配列番号５で示されるアミノ酸配列、
（３）配列番号７で示されるアミノ酸配列、
（４）配列番号９で示されるアミノ酸配列、
（５）配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
（６）配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
（７）配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、及び
（８）配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡ。
【請求項１８】
以下の（１）～（４）：
（１）配列番号３で示されるアミノ酸配列、
（２）配列番号５で示されるアミノ酸配列、
（３）配列番号７で示されるアミノ酸配列、
（４）配列番号９で示されるアミノ酸配列、
（５）配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
（６）配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
（７）配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、及び
（８）配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗体軽鎖をコードするＤＮＡ。
【請求項１９】
造血幹細胞移植後の血球回復促進用であるヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体を有効成分として含む血球増多剤。
【請求項２０】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む請求項１９に記載の血球増多剤。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒトトロンボポエチン受容体（別名：ヒトｃ－Ｍｐｌ）に対するアゴニスト抗体に関する。
さらに本発明は、抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体を有効成分とする、臨床上血小板を増多させる必要のある患者／疾患に対する治療剤、特に血小板減少症治療剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
＜ＴＰＯとＴＰＯ受容体について＞
トロンボポエチン（Ｔｈｒｏｍｂｏｐｏｉｅｔｉｎ：ＴＰＯ）は、生体内で巨核球および血小板の増殖を促進する造血因子である。ヒトＴＰＯは全長３３２アミノ酸残基からなる糖タンパク質であり、その活性にはＮ末端側の配列が重要であることが知られている。細胞膜上のＴＰＯ受容体と結合することで機能を発揮する。
ｃ－Ｍｐｌは、現在知られている唯一のＴＰＯ受容体である。ヒトｃ－Ｍｐｌは、シグナルペプチドを含むと６３５アミノ酸、成熟型は６１０アミノ酸からなる膜一回貫通型糖タンパク質であり、Ｉ型のサイトカイン受容体ファミリーに属している。ヒトｃ－ＭｐｌのメッセンジャーｒＮＡおよびタンパク質の配列は既に報告されている（Ｇｅｎｂａｎｋ：ＮＭ＿００５３７３，ＮＰ＿００５３６４参照）。同じファミリーの分子としてエリスロポエチン受容体（ＥｐｏＲ）や、Ｇ－ＣＳＦ受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）、インターロイキン３受容体（ＩＬ－３Ｒ）などを挙げることができる。ヒトｃ－Ｍｐｌは細胞外に２つのＣＲＨ（Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ）ドメイン（Ｎ末端側からＣＲＨ１，ＣＲＨ２と呼ばれる）を持ち、そのなかにサイトカイン受容体ファミリーに特徴的なＷＳＸＷＳモチーフを含んでいる。細胞内ドメインにはＢｏｘ１，Ｂｏｘ２と呼ばれる二つの配列があり、これらはシグナル伝達に必須である。ＴＰＯはＣＲＨ１に結合し、ｃ－Ｍｐｌを二量体化することでシグナルを入れると考えられているが、詳細な結合および活性化の様式は解明されていない。ｃ－Ｍｐｌが二量体化すると、細胞内ドメインに結合したシグナル伝達キナーゼが活性化され、リン酸化シグナルが細胞内に伝えられる。ＴＰＯ－ＭｐｌシグナルによってＪａｋ－ＳＴＡＴ，ＰＩ３Ｋ－Ａｋｔ，Ｒａｓ－ＭＡＰＫの各経路が動かされることが知られている。ＴＰＯまたはｃ－Ｍｐｌを欠損したマウスは、血小板数が野生型マウスの１０－２０％程度まで減少することが報告されており、ＴＰＯ－Ｍｐｌシステムが血小板数を調節する主要なシステムであることを示している。ｃ－Ｍｐｌの発現は、巨核球のみならず、さらに未分化な造血前駆細胞や造血幹細胞にも認められる。骨髄中のｃ－Ｍｐｌ陽性細胞画分は、ｃ－Ｍｐｌ陰性画分に比べ、高い骨髄再構築能を持っていることが示されており、また、ｃ－Ｍｐｌ欠損マウスでは巨核球・血小板だけではなく造血幹細胞も減少していることが判っている（非特許文献１，２参照）。これらの知見から、ＴＰＯ－Ｍｐｌシステムが造血系に幹細胞レベルから関与していることが示唆されている。
ＴＰＯがクローニングされて以来、血小板減少症の治療薬としての利用が期待され、これまでに二種類の組換え型ＴＰＯの臨床試験が行われている（非特許文献３参照）。完全長のヒトＴＰＯ（ｒｈＴＰＯ）と、ヒトＴＰＯの活性部位であるＮ末端側１６３アミノ酸のペプチド配列をポリエチレングリコール（ＰＥＧ）化したＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ（Ｐｅｇｙｌａｔｅｄ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｍｅｇａｋａｒｙｏｃｙｔｅ Ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｆａｃｔｏｒ）である。臨床試験において、これらの組換え型ＴＰＯは健常人および特発性血小板減少性紫斑病（Ｉｄｉｏｐａｔｈｉｃ Ｔｈｒｏｍｂｏｃｙｔｏｐｅｎｉｃ Ｐｕｒｐｕｒａ：ＩＴＰ）患者の血小板を増加させることに成功している。また、骨髄非破壊的な化学療法に伴う血小板減少症を軽減させる効果が示されている。さらに、例数は少ないながらも、再生不良性貧血（Ａｐｌａｓｔｉｃ Ａｎｅｍｉａ：ＡＡ）、骨髄異形成症候群（Ｍｙｅｌｏｄｙｓｐｌａｓｔｉｃ Ｓｙｎｄｒｏｍｅ：ＭＤＳ）の患者に対しても組換え型ＴＰＯの有効性が報告されている（非特許文献４，５）。

＜ｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体について＞

ＴＰＯと同様にｃ－Ｍｐｌを介してシグナルを入れる性質を持ちながら、分子としては全く異なる種々のＴＰＯミメティクスが研究されている（非特許文献６，７参照）。ミメティクスには大きく分けて、ペプチド性低分子、非ペプチド性低分子、抗体由来分、アゴニスト抗体などが知られている。

公知の抗ｃ－Ｍｐｌアゴニストヒト抗体として、１２Ｂ５，１２Ｅ１０，１２Ｄ５（特許文献１参照）を挙げることができる。これらは全長抗体（Ｗｈｏｌｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ、例えばＷｈｏｌｅ ＩｇＧ）の形態でプライマリーヒト細胞に対する活性を持たない。なお、本明細書で使用するプライマリーヒト細胞とは、ＴＰＯに対して高感受性を有する樹立された特殊な株化細胞やＴＰＯ受容体遺伝子を遺伝子組換え技術により導入し該受容体を高発現させた細胞ではなく、ヒト臍帯血やヒト骨髄由来のＣＤ３４＋細胞等の本来生体内でＴＰＯの作用対象となっている細胞を意味する。

また、公知のアゴニストマウス抗体として、ＢＡＨ－１（特許文献２，非特許文献８参照），ＶＢ２２Ｂ（特許文献３参照）を挙げることが出来るが、マウス抗体はヒト血中において抗原性を示すことが知られており、医薬品としての利用には適さない。また、一般に、アゴニスト抗体を、全長抗体で、例えばＣＤＲ ｇｒａｆｔｉｎｇ等の方法を用いて、その活性を保ったままヒト化することは困難である（特許文献３，非特許文献９参照）。従って、上記のような公知のアゴニスト抗体が存在するとしても、プライマリー細胞に作用するアゴニストヒト抗体の創出は容易ではない。

また前述のＴＰＯミメティクスで述べた抗体由来の低分子も、ある種のアゴニスト抗体であり、抗体の一部を利用改変したＤｉａｂｏｄｙ，一本鎖（Ｆｖ）$_2$（ｓｃ（Ｆｖ）$_2$）が報告されている（特許文献１，３参照）。しかしながら、この方法によって作出された改変抗体は、分子の大幅な改変による抗原性が懸念されるうえ、全長抗体に比べ血中半減期が短縮される等、医薬品として利用するためには課題が多い。

以上、全長抗体は低抗原性や血中半減期の長さ等、医薬品として有用な性質を備えている一方、上述のように、全長抗体で充分な活性を持つアゴニストヒト抗体を作製するのは容易ではない。

そこで、以下に述べるように、本発明者らは、抗体の構造に大幅な改変を加えることなく、充分な活性を持ったアゴニストヒト抗体の取得を試み、その取得に至った。さらに抗体のヒンジ領域に改変を加え、アゴニスト活性を増強することに成功した。本発明によって作出された抗体は血小板減少症治療薬としての利用に適していると考えられる。

【非特許文献１】宮崎洋，「トロンボポエチンの将来展望」，Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４６（３），３１１－３１６，２０００
【非特許文献２】Ｍｕｒｏｎｅ Ｍら，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １６：１－６，１９９８
【非特許文献３】Ｋｕｔｅｒ ＤＪら，Ｂｌｏｏｄ １００（１０）：３４５７－６９，２００２
【非特許文献４】Ｙｏｎｅｍｕｒａ Ｙら，Ｉｎｔ Ｊ Ｈｅｍａｔ（８２）３０７－３０９，２００５
【非特許文献５】Ｋｏｍａｔｓｕ Ｎら，Ｂｌｏｏｄ ９６ ２９６ａ，２０００
【非特許文献６】Ｂｒｏｕｄｙ ＶＣら，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ．２５（２）：５２－６０，２００４
【非特許文献７】Ｗａｎｇ Ｂら，Ｃｌｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ．７６（６）：６２８－３８，２００４
【非特許文献８】Ｄｅｎｇ Ｂら，Ｂｌｏｏｄ ９２（６）：１９８１－１９８８，１９９８
【非特許文献９】Ｊｉ Ｈｅｅ Ｓｏｎら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２８６：１８７－２０１，２００４
【特許文献１】国際公開第ＷＯ ９９／１０４９４号パンフレット
【特許文献２】国際公開第ＷＯ ９９／０３４９５号パンフレット

【特許文献３】国際公開第ＷＯ　２００５／０５６６０４号パンフレット
【発明の開示】
【０００３】
本発明の目的は、新規な抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体を提供することである。
本発明において、抗体とは、これまで全長抗体では困難であった、ヒトｃ－Ｍｐｌに対し天然のリガンドであるＴＰＯとほぼ同等のシグナルを入れることができ、プライマリーヒト細胞に対する増殖刺激活性を有する抗体である。
本発明の第２の目的は、抗体の断片化を行わずにアゴニスト抗体の活性を高める技術を提供することにより、抗体分子が本来持つ長半減期、低抗原性といった医薬品として望ましい性質を有する新規な抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体を提供することである。
上記課題を解決するため、本発明者らは、抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体の研究に鋭意取り組んだ。その結果、全長抗体で、天然リガンドとほぼ同等のシグナルを生じ、ヒトプライマリー細胞に対する活性を有するヒト抗体を取得した。また、取得したアゴニスト抗体につき更に鋭意検討を行い、抗体の断片化を行わずにそのアゴニスト活性を高める改変方法を見出し、本発明を完成するに至った。
すなわち、本発明は以下の特徴を含む。
１．ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体
本発明にかかるヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体は、以下の（１）～（６）に示す抗体を含む。
（１）抗体の定常領域が以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）：
（ｉ）　ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
（ｉｉ）　ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
（ｉｉｉ）前記（ｉ）又は（ｉｉ）のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の（ａ）及び／又は（ｂ）：
（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１０，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、
（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、活性が下記の構造を有するＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの５０％以上であり、かつ５０％有効濃度（ＥＣ５０）が１００ｎＭ以下であること、
の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体。
本明細書中、ヒト抗体サブクラスは、ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３及びＩｇＧ４を含む。ヒトイムノグロブリンの定常領域等の配列は、例えばＮＣＢＩホームページ（ＧｅｎＢａｎｋ、ＵｎｉＧｅｎｅなど）から入手可能であり、例えばヒトＩｇＧ１重鎖定常領域については登録番号Ｊ００２２８、ヒトＩｇＧ２重鎖定常領域については登録番号Ｊ００２３０、ヒトＩｇＧ３重鎖定常領域については登録番号Ｘ０３６０４、ヒトＩｇＧ４重鎖定常領域については登録番号Ｋ０１３１６、ヒト軽鎖κ定常領域については登録番号Ｖ００５５７，Ｘ６４１３５，Ｘ６４１３３など、ヒト軽鎖λ定常領域については登録番号Ｘ６４１３２，Ｘ６４１３４などを含むことができる。
本明細書中、ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法とは、後述の実施例６に記載した測定法を意味し、コロニー形成に必要な抗体の濃度は、この測定法に基づき求めることができる。
本明細書中、ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法とは、後述の実施例５に記載した測定法を意味し、増殖活性及びＥＣ５０はこの測定法に基づき求めることができる。
本明細書中、ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦとは、ヒトＴＰＯのアミノ末端受容体結合ドメインを含むトランケート化タンパク質をコードするｃＤＮＡを含有するプラスミドで形質転換された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）を使用して産生される（Ｕｌｉｃｈら，Ｂｌｏｏｄ　８６：９７１－９７６（１９９５））ポリペプチドを抽出し、リフォールディングし、精製

し、そのアミノ末端にポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分を共有結合させた配列番号１のアミノ酸配列を有する分子であり、以下の構造：
ＰＥＧ－ＮＨ－ＳＰＡＰＰＡＣＤＬＲＶＬＳＫＬＬＲＤＳＨＶＬＨＳＲＬＳＱＣＰＥＶＨ
ＰＬＰＴＰＶＬＬＰＡＶＤＦＳＬＧＥＷＫＴＱＭＥＥＴＫＡＱＤＩＬＧＡＶＴＬＬＬＥＧ
ＶＭＡＡＲＧＱＬＧＰＴＣＬＳＳＬＬＧＱＬＳＧＱＶＲＬＬＬＧＡＬＱＳＬＬＧＴＱＬＰ
ＰＱＧＲＴＴＡＨＫＤＰＮＡＩＦＬＳＦＱＨＬＬＲＧＫＶＲＦＬＭＬＶＧＧＳＴＬＣＶＲ
ＲＡＰＰＴＴＡＶＰＳ－ＣＯＯＨ
を有するものである。

本明細書中、ヒトｃ－Ｍｐｌを活性化するとは、ヒトｃ－Ｍｐｌを発現している細胞においてヒトｃ－Ｍｐｌに係る細胞内シグナル伝達を起こすことをいう。

本明細書中、数個なる用語は、２～約１０個、例えば２～９個、２～８個、２～７個、２～６個、２～５個、２～４個、又は２～３個の整数を意味する。

（２）上記コロニー形成測定法によりコロニー形成を誘導する活性を有し、及び／又は、上記ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法により細胞増殖活性を有する抗体のうち、コロニー形成活性については１０，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導する活性を有する、好ましくは１，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度で該活性を有する、より好ましくは１００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度で該活性を有する上記（１）の抗体。

（３）上記細胞増殖活性がＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの５０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは９０％以上の活性を示し、５０％有効濃度（ＥＣ５０）が、１００ｎＭ以下，好ましくは１０ｎＭ以下、より好ましくは１ｎＭ以下のものである上記（１）の抗体。

（４）上記コロニー形成測定法及び上記増殖能測定法の両者の測定方法によりそれぞれ以下の活性を示す上記（１）の抗体。

（ｉ）以下の（ａ）および（ｂ）の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体。

（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１０，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が下記の構造を有するＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの５０％以上であり、かつ５０％有効濃度（ＥＣ５０）が１００ｎＭ以下である。

（ｉｉ）以下の（ａ）および（ｂ）の性質を有する、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体。

（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１，０００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの７０％以上であり、かつＥＣ５０が１０ｎＭ以下である。

（ｉｉｉ）以下の（ａ）および（ｂ）の性質を有する、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体。

（ａ）ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－ＭＫコロニー形成測定法において、１００ｎｇ／ｍＬ以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

（ｂ）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの９０％以上であり、かつＥＣ５０が１ｎＭ以下である。

（５）以下の（ａ）～（ｈ）からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列可変領域及び軽鎖アミノ酸配列可変領域を有する上記（１）の抗体。（カッコ内に、各可変領域配列が由来する後述実施例の抗体の名称を示す。）

（ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：７－１０）

（ｂ）配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号５で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：４－４９）

（ｃ）配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号７で示される

アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：６－４－５０）
（ｄ）配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：６－５－２）
（ｅ）配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号３で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列
を含む軽鎖可変領域。
（ｆ）配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号５で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
（ｇ）配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
（ｈ）配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
（６）ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、上記（１）～（５）に記載の抗体。

２．重鎖改変アゴニスト抗体

本発明に係る重鎖改変アゴニスト抗体とは、以下のものを含む。
（１）重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の（ａ）～（ｂ）のアミノ酸配列から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のＣ末端側がヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列或いは該Ｇ４のアミノ酸配列においてＡＤＣＣ（抗体依存性細胞障害）活性等に係るアゴニスト抗体として好ましくない性質に関する部位を変異させたアミノ酸配列を有するアゴニスト抗体。
（ａ）配列番号１０で示されるアミノ酸配列。
（ｂ）配列番号１１で示されるアミノ酸配列。
本明細書の中で用いるアッパーヒンジ（Ｕｐｐｅｒ　ｈｉｎｇｅ）とは、Ｋａｂａｔ　ＥＵ番号付け（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５^{ｔｈ}　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１））による表記で２１６位以降、２２６位よりＮ末端側の配列を指す。ミドルヒンジ（Ｍｉｄｄｌｅ　ｈｉｎｇｅ）とは、同表記で２２６位以降、２３１位よりＮ末端側の配列を指す。ヒトイムノグロブリンＧ４を含む各サブタイプにつき、アッパーヒンジ、ミドルヒンジ及びその前後のアミノ酸配列を図４Ｂに示す。図中、ＣＨ１はアッパーヒンジに隣接するＣＨ１領域の一部、ＣＨ２はＣＨ２領域中のローワーヒング（ｌｏｗｅｒ　ｈｉｎｇｅ）と称される部分である。
（２）上記重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のＣ末端側が、ヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列において、Ｋａｂａｔ　ＥＵ番号付けにおける２２８位セリンがプロリンに且つ２３５位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体。
（３）以下の（ｉ）又は（ｉｉ）に示された、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニストヒト抗体である上記（２）の重鎖改変抗体。
（ｉ）重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が以下の（ａ）～（ｂ）のアミノ酸配列から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のＣ末端側がヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列或いは該Ｇ４のアミノ酸配列においてＫａｂａｔ　ＥＵ番号付けにおける２２８位セリンがプロリンに且つ２３５位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含むヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体。
（ａ）配列番号１０で示されるアミノ酸配列。

（ｂ）配列番号１１で示されるアミノ酸配列。
（ｉｉ）更に好ましい実施形態としては、以下（ａ）～（ｈ）からなる群から選択される、上記（ｉ）に記載のヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体を挙げることができる。
（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番３のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｂ）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｃ）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｄ）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｅ）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｆ）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｇ）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
（ｈ）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。

３．ヒトｃ－ＭＰＬに対するアゴニスト抗体の医薬用途及び医薬組成物

本発明に係るヒトｃ－ＭＰＬに対するアゴニスト抗体は、ｃ－Ｍｐｌ受容体に結合しそれを活性化する能力、および／または（インビボおよびインビトロの両方で）血小板の産生を刺激する能力（「血小板生成活性」）および血小板前駆体の産生を刺激する能力（「巨核球生成活性」）を有する。

本発明に係るヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物／医薬用途としては、具体的には次のものを挙げることができる。
（１）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかの抗体を有効成分とする医薬組成物。
（２）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかに記載の抗体を有効成分とする血小板増多剤。
（３）骨髄移植、臍帯血移植時の血小板回復促進用であることを特徴とする上記（２）に記載の血小板増多剤
（４）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかの抗体を有効成分とする血小板減少症治療剤。
（５）血小板減少症が、以下の（ａ）～（ｆ）のいずれか１つである、上記（４）に記載の血小板減少症治療剤。
（ａ）特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、
（ｂ）癌化学療法後の血小板減少症、
（ｃ）再生不良性貧血、
（ｄ）骨髄異形性症候群（ＭＤＳ）、
（ｅ）肝疾患にともなう血小板減少症、又は
（ｆ）骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症。
（６）造血幹細胞移植後の血球回復促進用であるヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体を有効成分として含む血球増多剤。
（７）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む上記（６）に記載の血球増多剤。

４．本発明に係る抗体の製造方法

本発明の抗体は、本発明に係る抗体を産生するハイブリドーマを用いて抗体を製造してもよいし、又は、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を製造することもできる。本発明の抗体の製造方法として、好ましくは、以下の方法が挙げられる。

下記の（ａ）～（ｈ）：

（ａ）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

（ｂ）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

（ｃ）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

（ｄ）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

（ｅ）配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

（ｆ）配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

（ｇ）配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、及び

（ｈ）配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

からなる群から選択される、重鎖をコードする塩基配列を含むＤＮＡ及び軽鎖をコードする塩基配列を含むＤＮＡと、それらのＤＮＡの発現を制御する塩基配列を含む１又は複数のＤＮＡとを保持する哺乳動物細胞を作製し、該哺乳動物細胞を培養した培養液から、該重鎖及び軽鎖からなる抗体をコードするＤＮＡの発現産物を単離精製することを含む、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体の製造方法。

５．本発明に係るＤＮＡ

本発明に係るＤＮＡとして、以下のものを挙げることができる。

（１）ヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む新規なＤＮＡであって、以下の（ａ）～（ｄ）からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡ：

（ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号４で示されるアミノ酸配列；

（ｃ）配列番号６で示されるアミノ酸配列；

（ｄ）配列番号８で示されるアミノ酸配列。

（２）ヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む新規なＤＮＡであって、以下の（ａ）～（ｈ）からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡ：

（ａ）配列番号３で示されるアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号５で示されるアミノ酸配列；

（ｃ）配列番号７で示されるアミノ酸配列；

（ｄ）配列番号９で示されるアミノ酸配列；

（ｅ）配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；

（ｆ）配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；
（ｇ）配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；
（ｈ）配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列。
（３）上記（１）又は（２）のＤＮＡが、それぞれ可変領域及び定常領域を含む抗体重鎖或いは軽鎖をコードするＤＮＡ。
（４）抗体の重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の（ａ）及び（ｂ）のアミノ酸配列から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のＣ末端側がヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列或いは該Ｇ４のアミノ酸配列においてＫａｂａｔ　ＥＵ番号付けにおける２２８位セリンがプロリンに且つ２３５位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、上記（３）に記載の抗体重鎖をコードするＤＮＡ。
（ａ）配列番号１０で示されるアミノ酸配列。
（ｂ）配列番号１１で示されるアミノ酸配列。
本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願２００６－８１３２２号、２００６－２９９５５４号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【０００４】
図１は、アゴニスト抗体結合活性を示す。ＦＤＣＰ－ｈＭｐｌ細胞とＦＤＣＰ２細胞（ＦＤＣＰ　ｐａｒｅｎｔ）を用いたフローサイトメトリー（実施例２）で、図示した各抗体の結合活性を調べた。各抗体はヒトｃ－Ｍｐｌ特異的に結合することが示された。
図２は、ＵＴ７／ＴＰＯアッセイ結果を示す。図Ａ～Ｄに示した各精製抗体（ＩｇＧ１）のＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイ（実施例５）における各抗体の増殖曲線を示した。
図３は、ＣＦＵ－Ｍｋアッセイ結果を示す。これは、ヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたコロニー形成アッセイ（実施例６）の結果である。
図４Ａは、組換え抗体作製に関するＮ５ＫＧ１ベクターの構造を示す。図中、Ｃはサイトメガロウイルスのプロモーター／エンハンサー、Ｂはウシ成長ホルモンポリアデニル化領域、Ｎ１はネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン１、Ｋはヒトイムノグロブリンκ定常領域、Ｇ１はヒトイムノグロブリンγ１定常領域、ＢＴはマウスβグロブリン主要プロモーター、Ｎ２はネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン２、Ｄはジヒドロ葉酸レダクターゼ、ＶＨは重鎖可変領域、ＶＬは軽鎖可変領域をそれぞれ表す。
図４Ｂは、組換え抗体作製に関する、天然型のヒトイムノグロブリンと、ＩｇＧ４ＰＥ，ＩｇＧ４３４４，ＩｇＧ４３４４ｈ１，ＩｇＧ４３４４ｕｈ，ＩｇＧ４３４４ｕｈｍのＣＨ１領域とヒンジ領域（アッパーヒンジ及びミドルヒンジ）のアミノ酸配列を示す。
図４Ｃ（すなわち、図４Ｃ－１～図４Ｃ－３）は、組換え抗体作製に関する、Ｎ５ＫＧ１＿７－１０，Ｎ５ＫＧ１＿４－４９発現ベクター作製工程図を示す。
図４Ｄ（すなわち、図４Ｄ－１～図４Ｄ－３）は、組換え抗体作製に関する、Ｎ５ＫＧ１＿６－４－５０，Ｎ５ＫＧ１＿６－５－２発現ベクター作製工程を示す。
図４Ｅは、組換え抗体作製に関する、図示した各種改変重鎖の定常領域の配列を示す。
図４Ｆ（すなわち、図４Ｆ－１～図４Ｆ－２）は、組換え抗体作製に関する、７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ重鎖の核酸およびアミノ酸配列を示す。
図４Ｇは、組換え抗体作製に関する、７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ軽鎖の核酸およびアミノ酸配列を示す。
図５は、ヒンジ改変抗体の活性を示す。Ａ：ＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイにおける４－４９Ｇ１，４－４９Ｇ３３１１，４－４９Ｇ３３３１の活性。Ｂ：ＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイにおける７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ，４－４９Ｇ４３４４ｕｈｍの活性。
図６Ａは、シグナル伝達解析（実施例１１）における、アゴニスト抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ，４－４９Ｇ４３４４ｕｈｍのシグナル伝達解析結果を示す。

図６Ｂは、シグナル伝達解析（実施例１１）における、アゴニスト抗体６－５－２Ｇ１，６－５－２Ｇ３３４４のシグナル伝達解析結果を示す。

図７は、ヒト血小板プライミング作用を示す。これは、実施例１２記載の試験の結果を示す。アゴニスト抗体７－１０Ｇ３３１１，４－４９Ｇ３３１１によるヒト血小板プライミング作用が示された。また、アゴニスト抗体のみ（ＡＤＰ非添加）では血小板の凝集は起こらないことが示された。

図８は、カニクイザルへのアゴニスト抗体投与による血小板数の変化を示したグラフである。実施例１３に記載のように、カニクイザルにアゴニスト抗体を投与し、血小板数をモニターした。矢印は一回目（ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ）および二回目（アゴニスト抗体）の投与日を示す。

図９Ａは、ＮＯＧ臍帯血移植モデルマウスにおいてＣＤ３４＋細胞を１，０００個（右図）又は１０，０００個（左図）を移植した後に被検物質を投与したときの末梢血ヒト血小板数の経時的推移を示す。図中、Ｐｒｅは投与前の血小板数を示す。

図９Ｂは、ＮＯＧ臍帯血移植モデルマウスにおいてＣＤ３４＋細胞を１，０００個（右図）又は１０，０００個（左図）を移植した後に被検物質を投与したときの、移植後６週における骨髄ヒト前駆細胞数（ｃｏｌｏｎｙ　ｃｏｕｎｔ；ＧＭ＋Ｅ＋ＧＥＭ）を示す。前駆細胞数は、巨核球系以外の合計細胞数であり、ＧＭは顆粒球・マクロファージ系、Ｅは赤血球系、ＧＥＭはＣｏｌｏｎｙ－ｆｏｒｍｉｎｇ－ｕｎｉｔ－ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｅｒｙｔｈｒｏｉｄを表わす。結果は、平均±標準偏差（ｍｅａｎ±ＳＤ）で表わしている。また、ベヒクル（Ｖｅｈｉｃｌｅ）はコントロールとしてのＰＢＳ（リン酸緩衝塩水）を表わし、また、ＮＴは非処理（Ｎｏｎ－ｔｒｅａｔｅｄ）を表わす。

図９Ｃは、ＮＯＧ臍帯血移植モデルマウスにおいてＣＤ３４＋細胞を１，０００個（右図）又は１０，０００個（左図）を移植した後に被検物質を投与したときの、移植後６週における末梢血ヒト細胞キメラ率を示す。ベヒクル（Ｖｅｈｉｃｌｅ）は対照としてのＰＢＳ（リン酸緩衝塩水）を表わし、また、ＮＴは非処理（Ｎｏｎ－ｔｒｅａｔｅｄ）を表わす。

図１０は、ヒトＭｐｌ　Ｔｇマウスへのアゴニスト抗体投与後の血小板数の経日推移を示す。対照として、該ＴｇマウスへのＴＰＯ又はベヒクル（ＰＢＳ）の投与、並びに、非Ｔｇ（野生型；Ｎｏｎ－Ｔｇ）マウスへの７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ（１０μｇ）の投与実験を行い、その結果も示した。結果は、平均±ＳＥＭで表わした。

図１１は、アゴニスト抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍの軽鎖変異抗体のＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞への結合性を示す。

図１２は、アゴニスト抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍの軽鎖変異抗体に関するＵＴ－７／ＴＰＯ細胞を用いた細胞増殖アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【０００５】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、プライマリーヒト細胞に作用する抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニストヒト抗体を提供する。

本発明における抗体は、ヒト抗体産生マウス（例えば、ＫＭマウス^{TM}（キリンビール社））をヒトＭｐｌ組換えタンパク質もしくはヒトＭｐｌ発現細胞で免疫し、通常のモノクローナル抗体作製法にて単離することができる。また、ハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、発現ベクターを構築し、発現細胞を作製し、その過程で、種々の定常領域を有する組換え抗体を作製することができる。

１．本発明に係る抗体について

本明細書において抗体とは、Ｆａｂ領域、ヒンジ領域、Ｆｃ領域を有する抗体を意味し、天然に存在する抗体、及び、同様の構成を有する範囲において、それ自体公知の方法で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマにより産生される、或いは、一旦抗体遺伝子を取得しそれを用いて遺伝子工学的に産生される抗体、更に部位特異的突然変異誘発

法により一部改変され遺伝子工学的に産生される抗体を含む。そして本発明に係るヒトｃＭｐｌに対するアゴニスト抗体及び重鎖改変アゴニスト抗体は前述した通りのものである。

一般に、アゴニスト抗体は細胞膜上の標的分子に結合し、複合体を形成させることでシグナルを伝える。ホモ二量体を形成するサイトカイン受容体ファミリー、例えばエリスロポエチン受容体（ＥｐｏＲ）、Ｇ－ＣＳＦ受容体（Ｇ－ＣＳＦＲ）、トロンボポエチン受容体（ｃ－Ｍｐｌ）等に対するアゴニスト抗体は、二価の抗体が、二つの分子と結合することで二量体を形成させると考えられる。多くのアゴニスト抗体がＦａｂ断片のみでは活性を示さないこともそれを示唆している。

複合体形成には、二つの抗原結合部位が接近し易いことが重要と考えられる。全長抗体では充分な活性を持たない抗体でも、ｓｃ（Ｆｖ）$_2$等の形態に低分子化することでアゴニスト活性が上昇するのはこのことを示唆している。一方で、低分子化抗体は、分子の大幅な改変による抗原性が懸念されるうえ、血中半減期が短縮される等、医薬品として利用するためには課題が多い。全長抗体の持つ、低抗原性や血中半減期の長さ等、医薬品として有用な性質を生かすためには、抗体の構造に大幅な改変を加えることなく、高い活性を持ったアゴニスト抗体が望まれる。

後述の実施例２に示すように、本発明者らは、免疫の方法に工夫をこらし、全長抗体で高い活性を持った抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体を取得した。工夫とは、例えば高発現細胞株による免疫や恒常活性型の変異受容体発現細胞を用いた免疫である。該アゴニスト抗体は後述の実施例６に記載のヒト臍帯血ＣＤ３４＋細胞を用いたコロニーアッセイでコロニー形成を誘導することが示されており、医薬品として有用であることが期待される。

さらに、本発明者らはヒンジ部分の柔軟性を高めることで、複合体形成の効率を高め、アゴニスト活性を増強することを考案した。柔軟性の高い配列は、例えばグリシンリンカーのような配列を考えることができる。もしくは、ヒトＩｇＧの中でも、最も柔軟性が高いＩｇＧ３のヒンジ領域を用いることができる。抗体の低抗原性を損なわないためには、なるべく天然に存在する配列を用いることが望ましい。そこで、ＩｇＧ３のヒンジ配列がより好ましい。

また、遺伝子工学的改変により、細胞傷害活性が低く、かつ、高いヒンジの柔軟性を持った、アゴニスト抗体に最適な定常領域として、ヒトＩｇＧ３のアッパーヒンジ領域を持ち、ミドルヒンジ以降Ｃ末端側の領域はヒトＩｇＧ４の配列とするような抗体の作製も可能である。

より具体的には、当業者に周知である遺伝子工学的改変（例えば、欧州特許ＥＰ３１４１６１公報を参照のこと）により異なるサブクラスのものに変換し、即ち、本発明の抗体の可変領域をコードするＤＮＡを用いて遺伝子工学的手法を用いて元のサブクラスとは異なるサブクラスの抗体に変更することができる。更にヒトＩｇＧ４重鎖定常部分のＥＵ番号付け（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２を参照）における２２８番目のセリンをプロリンに変異させることにより、ＩｇＧ４の分子内架橋（Ｓ－Ｓ結合）による単量体形成を抑制することが、また、同じく２３５番目ロイシンをグルタミン酸に変異させることにより、抗体依存性細胞傷害（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ：ＡＤＣＣ）活性を低減させることができる。上記二つの変異を持ったＩｇＧ４をＩｇＧ４ＰＥと呼ぶ。

上記の事柄を考慮し、本発明者らは細胞傷害活性が低く、かつ、高いヒンジの柔軟性を持った、アゴニスト抗体に最適な定常領域を作製した。本定常領域は、ヒトＩｇＧ３のアッパーヒンジ領域を持ち、ミドルヒンジ以降Ｃ末端側の領域はヒトＩｇＧ４の配列となっている。この定常領域と抗ｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体の可変領域を組み合わせることにより、安全性と高活性を兼ね備えたアゴニスト抗体を作製することができる。

２．本発明に係る抗体の製造方法

本発明の抗体は、種々の方法により生産できるが、まずは本発明抗体産生ハイブリドーマを得る必要がある。後述の実施例１に記載するような本発明の抗原を用い、マウス等を

免疫し、特にヒト抗体を得る場合にはヒト抗体産生トランスジェニックマウスなどの非ヒト哺乳動物に免疫する。モノクローナル抗体は、定法に従い、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）を融合することにより得られるハイブリドーマを培養し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって取得することができる。取得した抗体群から更にアゴニスト抗体を選択する必要があるが、アゴニスト抗体の作用対象受容体に対するリガンドの活性測定方法として確立した方法を用いればよく、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体を選択する場合は、後述の実施例５に示したＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイ等のＴＰＯ活性測定方法として既に確立された方法を用いて適宜行うことができる。

本発明に係るヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体、特にモノクローナル抗体の製造にあたっては、下記の工程を包含する。すなわち、（１）免疫原として使用する、生体高分子の精製及び／又は抗原タンパク質を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、（２）抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、（３）骨髄腫細胞（ミエローマ）の調製、（４）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、（５）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、（６）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、（７）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、（８）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、（９）モノクローナル抗体遺伝子のクローニングと組換え抗体作製等である。

以下、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニストモノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

（１）抗原

一般にヒトｃ－ｍｐｌ抗体を得る場合には、ヒトｃ－Ｍｐｌタンパク質の一次構造が公知（Ｇｅｎｂａｎｋ：ＮＰ＿００５３６４参照）であるので、当業者に周知の方法により、ｃ－Ｍｐｌのアミノ酸配列からペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することができ、またｃ－Ｍｐｌの細胞膜貫通領域および細胞内領域を欠損した可溶化ｃ－Ｍｐｌ組換えタンパク質を抗原として用いることもできる。

或いは、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株等のヒトｃ－Ｍｐｌ発現細胞株の抗原としての利用が挙げられる。但し、ヒトｃ－Ｍｐｌ発現細胞株としては、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株が知られているが、これらの細胞株のｃ－Ｍｐｌ発現量は細胞あたり数千分子と低く、抗原には不向きである。実際、マウス造血系細胞株であるＦＤＣＰ２にヒトｃ－Ｍｐｌを導入した発現株ＦＤＣＰ－ｈＭｐｌ（ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．１９９６ Ｏｃｔ ２１；３９５（２－３）：２２８－３４参照）をヒト抗体産生マウス（ＫＭマウス^{TM}）に免疫した場合、抗体価上昇が不十分であり、ｈＭｐｌ特異的なヒト抗体を得ることができなかった。また、ヒト巨核球系細胞株を抗原として用いる場合、他の膜分子に対する抗体も誘導されるため、ｃ－Ｍｐｌ特異的な抗体を効率良く誘導するには必ずしも適切でない。従って、目的とするものが単にヒトｃ－ｍｐｌ抗体でなくアゴニスト活性を有する抗体の取得に際し抗原タンパク質を発現する細胞株を免疫に用いる場合には、発現量が高い細胞を選択することが望ましい。特に、マウス細胞株、しかも可能な限りＭＨＣ適合した細胞株を宿主に、ヒトｃ－Ｍｐｌを導入した高発現株を用いるのが望ましい。例として、後述の実施例１に記載の細胞（発現ベクターとしてヒトｃ－ｍｐｌ全長遺伝子が担持されたｐＥＦ－ＭＰＬ６３５或いはｐＣＭＶ－ＭＰＬ６３５を、宿主としてマウス細胞株Ｌ９２９およびＦＭ３Ａを用いたもの）を挙げることができる。

また、野生型のヒトｃ－ｍｐｌに代えて、ヒトｃ－ｍｐｌの恒常活性型変異体（例えば、５０８番目ＴｒｐがＳｅｒに変異しリガンド非依存性に恒常的にアゴニストシグナルを伝達する変異体；Ａｂｅ Ｍら、Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２００２ Ａｕｇ；１６（８）：１５００－１５０６）を同様の方法で強制発現させた細胞株を用いてもよい。このような変

異体は野生型とは立体構造が異なることが予想され、そのような恒常活性型変異体に親和性が高い抗体は、強力なアゴニスト活性を示す可能性がある。

また、これら強制発現細胞株は、ヒトｃＭＰＬ或いはその細胞外可溶性領域等と適宜組み合わせて抗原として用いることもできる。

（２）抗体産生細胞の調製工程

上記（１）で得られた抗原と、フロインドの完全若しくは不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、遺伝子改変によってヒト抗体を産生する能力を有するマウス（ヒト抗体産生マウス）が最適である。

本発明において用いられたヒト抗体産生マウス（例えばＫＭマウス^{TM}）は、内在性マウスイムノグロブリン（Ｉｇ）重鎖及びマウスκ軽鎖を欠損しており、かつ、ヒトＩｇ重鎖遺伝子を含む１４番染色体断片（ＳＣ２０）及びヒトＩｇκ鎖トランスジーン（ＫＣｏ５）を同時に保持する。このマウスはヒトＩｇ重鎖遺伝子座を持つ系統Ａのマウスと、ヒトＩｇκ鎖トランスジーンを持つ系統Ｂのマウスとの交配により作製される。系統Ａは、内因性Ｉｇ重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な１４番染色体断片（ＳＣ２０）を保持するマウス系統（Ｔｏｍｉｚｕｋａ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．，２０００ Ｖｏｌ９７：７２２）である。また、系統Ｂは内在性マウスＩｇ重鎖及びκ軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒトＩｇκ鎖トランスジーン（ＫＣｏ５）を保持するマウス系統（Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１９９６ Ｖｏｌ１４：８４５）である。従って、ＫＭマウスはヒト抗体を産生する能力を持ち、マウスＩｇ重鎖およびκ鎖を欠損したマウスである。

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射又は静脈内注射が好ましい。

免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは２週間から４週間間隔で）複数回繰返し行うことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後３～５日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、フローサイトメトリー法、放射性同位元素免疫定量法（以下、「ＲＩＡ法」という）、固相酵素免疫定量法（以下、「ＥＬＩＳＡ法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性、等の観点から、フローサイトメトリー法又はＥＬＩＳＡ法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばフローサイトメトリー法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、抗原を発現した細胞とヒト抗体を含む検体（例えばマウス血清，ハイブリドーマの培養上清，精製抗体等）と反応させる。さらに二次抗体として蛍光標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後、細胞に結合した二次抗体の量を蛍光によって測定することにより、抗体価を算出する。

（３）ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来るが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）ミエローマ株Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１（Ｐ３－Ｕ１）［Ｙｅｌｔｏｎ，Ｄ．Ｅ，ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，８１，１－７（１９７８）］、Ｐ３／ＮＳＩ／１－Ａｇ４－１（ＮＳ－１）［Ｋｏｈｌｅｒ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６，５１１－５１９（１９７６）］、Ｓｐ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ－２）［Ｓｈｕｌｍａｎ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ，２７６，２６９－２７０（１９７８）］、Ｐ３Ｘ６３Ａ

ｇ８．６５３（６５３）［Ｋｅａｒｎｅｙ，Ｊ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１２３，１５４８－１５５０（１９７９）］、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８（Ｘ６３）［Ｈｏｒｉｂａｔａ，Ｋ．ａｎｄ Ｈａｒｒｉｓ，Ａ．Ｗ．Ｎａｔｕｒｅ，２５６，４９５－４９７（１９７５）］などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば８－アザグアニン培地［グルタミン、２－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清（以下、「ＦＣＳ」という）を加えたＲＰＭＩ－１６４０培地に８－アザグアニンを加えた培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ；以下、「ＩＭＤＭ」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ；以下、「ＤＭＥＭ」という）で継代培養するが、細胞融合の３～４日前に正常培地（例えば、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地）で継代培養し、融合当日に2×10^{7}以上の細胞数を確保しておく。

（４）細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾臓、リンパ節、骨髄、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。次いで、脾細胞とミエローマを融合させればよい。この脾細胞と工程（３）で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えば、ＤＭＥＭ）、又はリン酸緩衝生理食塩液（以下、「ＰＢＳ」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が５：１～１０：１程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、撹拌しながら１ｍＬの５０％（ｗ／ｖ）ポリエチレングリコール（分子量１０００～４０００）を含む無血清培地を滴下する。その後、１０ｍＬの無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（以下「ＨＡＴ」という）液及びヒトインターロイキン－６（以下、「ＩＬ－６」という）を含む正常培地（以下、「ＨＡＴ培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下、「プレート」という）の各ウェルに分注し、５％炭酸ガス存在下、３７℃で２週間程度培養する。途中適宜ＨＡＴ培地を補う。

（５）ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、８－アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、ＨＡＴ含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、ＨＡＴ含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合細胞であるハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、ＨＡＴ培地からアミノプテリンを除いた培地（以下、「ＨＴ培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、フローサイトメトリー法により抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体価を測定する。以上、８－アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

（６）クローニング工程

前述（２）の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの１ウェルに１個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマ

ニュピレーターによって１個づつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって１個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便であり、よく用いられる。

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを２～４回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

（７）アゴニスト抗体の選択

得られた抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株の培養上清或いは後記（８）に従って該上清より精製した抗体を、種々のＴＰＯ活性測定系にて測定することにより、アゴニスト抗体を選択することができる。スクリーニングとして好適な方法として、哺乳動物細胞にヒトＭｐｌを発現させ、細胞増殖アッセイを行う方法が挙げられる。例えばマウス細胞株ＢａＦ３にヒトＭｐｌを発現させた細胞による増殖アッセイ（Ｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２００５ Ｊａｎ １５；１０５（２）：５６２－６．）等も使用し得るが、マウス細胞を用いた場合に、ヒト細胞の反応を反映しているとは限らないことを考慮すると、よりヒト細胞に強い活性を持つ抗体を選抜するにはヒトＭｐｌが発現しているヒト細胞を用いる増殖アッセイ方法がより好ましい。ヒト細胞による系として具体的には、後述の実施例５に記載のＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた細胞増殖アッセイを挙げることができる。

（８）ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をＨＴ培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、スピナー培養、あるいはホローファイバーシステム等を用いた培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲルろ過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えばＢＡＬＢ／ｃ）若しくはｎｕ／ｎｕマウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、ＭＡｂＴｒａｐ ＧＩＩキット；アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を利用することもできる。かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒトｃ－Ｍｐｌに対して高い抗原特異性を有する。

（９）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー（Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ）法、ＥＬＩＳＡ法、又はＲＩＡ法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ＥＬＩＳＡ法又はＲＩＡ法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び２８０ｎｍにおける吸光度［１．４（ＯＤ２８０）＝イムノグロブリン１ｍｇ／ｍＬ］より算出する方法等により行うことができる。また、ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、配列を決定することでサブクラスを特定することもできる。

（１０）モノクローナル抗体をコードする遺伝子のクローニングと組換え型抗体作製

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することもできる（Ｐ．Ｊ．Ｄｅｌｖｅｓ．，ＡＮＴＩＢＯＤＹ ＰＲＯＤＵＣＴＩＯＮ ＥＳＳＥＮＴＩＡＬ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ．，１９９７ ＷＩＬＥＹ、Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ａｎｄ Ｃ．Ｄｅａｎ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．，２０００ ＯＸＦＯＲＤ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ ＰＲＥＳＳ，Ｊ．Ｗ．Ｇｏｄｉ

ｎｇ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ．，１９９３ ＡＣＡＤＥＭＩＣ ＰＲＥＳＳ）。

本発明は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマが保有する抗体の遺伝子配列を含む核酸、特に後述の、本発明のハイブリドーマが産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の核酸も包含する。ここで、核酸にはＤＮＡ及びＲＮＡが含まれる。

ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を調製するには、モノクローナル抗体のＬ鎖Ｖ領域、Ｌ鎖Ｃ領域、Ｈ鎖Ｖ領域及びＨ鎖Ｃ領域をそれぞれコードするＤＮＡをＰＣＲ法等により調製する方法が採用される。プライマーは、抗体遺伝子又はアミノ酸配列から設計したオリゴＤＮＡを、鋳型としてはハイブリドーマから調製したＤＮＡを使用することができる。これらのＤＮＡを１つの適当なベクターに組み込み、これを宿主に導入して発現させるか、あるいはこれらのＤＮＡをそれぞれ適当なベクターに組み込み、共発現させる。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドＤＮＡとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージＤＮＡとしてはλファージが挙げられる。

形質転換に使用する宿主としては、抗体の立体構造を正しく構成できることから、真核細胞を挙げることができ、例えば、酵母、動物細胞（ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。特に動物細胞宿主を用いる場合、ベクターとしては、例えばＮ５ＫＧ１－Ｖａｌ Ｌａｒｋベクター（ＩＤＥＣ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ：ＵＳ ｐａｔｅｎｔ ６００１３５８）を用いることができる。本ベクターは、組換え抗体を動物細胞に発現させる目的で使用される発現ベクターで、２つのＣＭＶプロモーター／エンハンサーを持ち、それぞれの下流に重鎖および軽鎖可変領域のクローニングサイトを持つ。さらにその下流には、ヒトγ１鎖定常領域とヒトκ鎖定常領域をコードする遺伝子配列をあらかじめ持っている。本ベクターの可変領域クローニングサイトに任意の重鎖および軽鎖可変領域を、読み枠（フレーム）をあわせて組み込むことにより、軽鎖可変領域がヒトκ鎖定常領域と、重鎖可変領域がヒトγ１定常領域と連結された抗体を発現させることができる。本ベクターを導入された動物細胞は培養液中に抗体（ヒトＩｇＧ１）を産生する。また、異なる重鎖定常領域遺伝子を含むベクターも使用することができる。例えばＮ５ＫＧ４ＰＥベクター（ＩＤＥＣ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社製）は定常領域遺伝子として、ヒトγ４に、上述した二つの変異（Ｓｅｒ２２８Ｐｒｏ，Ｌｅｕ２３５Ｇｌｕ）が入った配列を持っている。Ｎ５ＫＧ４ＰＥベクターに任意の重鎖および軽鎖可変領域遺伝子配列を組み込むことで、任意の可変領域を持つＩｇＧ４ＰＥを発現させることができる。さらに、重鎖または軽鎖遺伝子に改変を加えることで、様々な定常領域を持った抗体を作製することが可能である。

もちろん、本発明に用いる哺乳動物細胞用発現ベクターは上記のものに限定されるものではない。例えば発現を制御する塩基配列として前述ＣＭＶプロモーター／エンハンサーを利用した他の発現ベクターを用いてもよいし、これとは異なった公知のプロモーター／エンハンサー（１若しくは複数）を発現制御配列として使ってもよい。プロモーターとしては、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（１９８９年７月５日公開のＵＫ２２１１５０４）、アデノウイルス（例えばアデノウイルス２）、ウシ乳頭腫ウイルス、鳥の肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、ヘテロローガスな哺乳動物プロモーター（例えばアクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱衝撃プロモーター）を挙げることができる。プロモーターに作用し転写を増大させるエンハンサーとしては、公知の哺乳動物遺伝子由来のエンハンサー（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトプロテイン、およびインシュリン）、および、真核細胞ウイルス由来のエンハンサー（複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー（ｂｐ１００－２７０）、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサー）を用いることができる。

また、発現ベクターには、転写の終止およびｍＲＮＡの安定化に必要な配列を含むこと

ができる。このような配列は普通、真核生物のまたはウイルスのＤＮＡまたはｃＤＮＡの５’および時には３’非翻訳領域から取得することができる。

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ＥＳ細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

本発明において、目的とする抗体は、形質転換体を培養し、その培養上清から採取することにより得ることができる。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

培養後、細胞外に生産された抗体の精製は、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により細胞を除去して行う。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（Ｗｒｉｇｈｔ，Ｇ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９，８３０－８３４）。

本発明に係るヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体の製法として、好ましい方法は、前述の［課題を解決するための手段］の４．にて例示した遺伝子組換え技術による方法であるが、これに限定されるものではない。

３．本発明に係るＤＮＡ

本発明は、上で述べたように、

（１）ヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列であって以下の（ａ）～（ｄ）から選択されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡ：

（ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号４で示されるアミノ酸配列；

（ｃ）配列番号６で示されるアミノ酸配列；

（ｄ）配列番号８で示されるアミノ酸配列；

及び、

（２）ヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列であって以下の（ａ）～（ｈ）から選択されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むＤＮＡ：

（ａ）配列番号３で示されるアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号５で示されるアミノ酸配列；

（ｃ）配列番号７で示されるアミノ酸配列；

（ｄ）配列番号９で示されるアミノ酸配列；

（ｅ）配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；

（ｆ）配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；

（ｇ）配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；

（ｈ）配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列；

を提供するものであり、上記２．の本発明に係るヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体の製法、より具体的には、遺伝子組換え技術を用いた抗体の製造において、用いることができ

る。

これら可変領域のアミノ酸配列（ａ）～（ｄ）をコードするＤＮＡは、前述のヒトＭｐｌに対するアゴニスト抗体産生ハイブリドーマ取得方法によって得られたハイブリドーマ株より、後述実施例７の通り、定法によりｍＲＮＡを抽出し既知である抗体定常領域のアミノ酸配列に基づくプライマーを用いて５’ＲＡＣＥ法により取得したものであり、その可変領域をコードする各ＤＮＡを含むプラスミドは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１－１－１つくばセンター中央第６）に２００６年３月１４日付にてブダペスト条約に基づく国際寄託がされている。

【表１】

表１

配列番号 (プラスミド名称)	受託番号	受託日
2 (Anti-hMpl 7-10_HV/pCR4)	FERM BP-10559	2006年3月14日
4 (Anti-hMpl 4-49_HV/pCR4)	FERM BP-10553	2006年3月14日
6 (Anti-hMpl 6-4-50_HV/pCR4)	FERM BP-10555	2006年3月14日
8 (Anti-hMpl 6-5-2_HV/pCR4)	FERM BP-10557	2006年3月14日
3 (Anti-hMpl 7-10_LV/pCR4)	FERM BP-10560	2006年3月14日
5 (Anti-hMpl 4-49_LV/pCR4)	FERM BP-10554	2006年3月14日
7 (Anti-hMpl 6-4-50_LV/pCR4)	FERM BP-10556	2006年3月14日
9 (Anti-hMpl 6-5-2_LV/pCR4)	FERM BP-10558	2006年3月14日

本発明のアゴニスト抗体を構成する軽鎖の可変領域は、その特定例として、配列番号３、５、７又は９に示されるアミノ酸配列を含むが、これらのアミノ酸配列のフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、付加又は挿入を含んでもよいし、或いはこれらのアミノ酸配列のフレームワーク領域の配列と少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％又は８９％、好ましくは少なくとも９０％、９２％、９３％又は９４％、より好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の同一性を有する配列を含んでいてもよい。フレームワーク領域は、可変領域において３つのＣＤＲ（相補性決定部位；ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ－ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）、すなわち配列番号３、５又は７に示されるアミノ酸配列においては、ＲＡＳＱＧＩＳＳ（Ａ又はＴ）ＬＡ（アミノ酸位置２４－３４）、ＤＡＳＳＬＥＳ（アミノ酸位置５０－５６）、及びＱＱＦＮＳＹＰ（Ｌ又はＹ又はＷ）Ｔ（アミノ酸位置８９－９７）、を除く領域を指し、配列番号９に示されるアミノ酸領域においては、ＲＡＳＱＳＶＳＳＳＹＬＡ（アミノ酸位置２４－３５）、ＤＡＳＳＲＡＴ（アミノ酸配列５１－５７）、及びＱＱＹＧＳＳＰＩＴ（アミノ酸位置９０－９８）、を除く領域を指す。後述の実施例１７で実証するとおり、フレームワーク領域内にアミノ酸変異が存在しても、本発明の変異型抗体は

いずれも、非変異型抗体の場合とほぼ同等のアゴニスト活性、すなわち、ＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞などのＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞のヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力及び／又はＵＴ－７／ＴＰＯ細胞の増殖能を有することができる。

そのような変異の例は、保存的アミノ酸間での置換である。保存的アミノ酸は、電荷、構造、極性などの性質が類似したアミノ酸群であり、例えば塩基性アミノ酸（Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ）、酸性アミノ酸（Ｇｌｕ、Ａｓｐ）、非極性アミノ酸（Ａｌａ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ）、極性アミノ酸（Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ）、芳香族アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ）に分類することができる。

また、配列同一性は、２つ又はそれ以上の配列を、ギャップを導入して又はギャップを導入しないで整列比較したときのアミノ酸（又はヌクレオチド）配列間の一致率を表わし、一般に全アミノ酸（又はヌクレオチド）数に対する同一アミノ酸（又はヌクレオチド）数のパーセンテージである。配列同一性は、必要に応じてＮＣＢＩ（米国）などのデータバンクにアクセスし、配列検索用のＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡなどの公知のアルゴリズムを利用して決定することができる。

変異の導入は、変異を含まないアミノ酸配列をコードするＤＮＡに対して、例えば部位特異的突然変異誘発法、ＰＣＲ法（変異を含むプライマーを使用する）などを適用することによって実施することができる。変異導入法は、例えばＳａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）などに記載されている。

本発明の上記ＤＮＡはさらに、可変領域に加え、それぞれ重鎖或いは軽鎖の定常領域をコードする塩基配列を含むものであってもよい。

また、本発明に係る抗体の製造方法の項で述べた重鎖定常領域の改変は、寄託したＤＮＡ及び公知のヒト抗体定常領域の配列に基づき、周知の遺伝子工学的改変手法により得ることができる。

４．ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体の医薬用途及び医薬組成物

本発明に係るヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体は、ｃ－ＭＰＬ受容体に結合しそれを活性化する能力、および／または（インビボおよびインビトロの両方で）血小板の産生を刺激する能力（「血小板生成活性」）および血小板前駆体の産生を刺激する能力（「巨核球生成活性」）を有する。

また、ヒトｃ－Ｍｐｌ受容体は、巨核球のみならず造血幹細胞においても発現しているとされている。正常動物において、ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ投与により骨髄中の赤芽球系や顆粒球／マクロファージ系の前駆細胞が増加したとの報告もある（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，１４：６５１－６６０，１９９６）。しかし、ヒト臍帯血移植マウスにおいては、ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦの投与によりマウスの巨核球系以外の前駆細胞の増殖は見られたが、ヒトの前駆細胞の増殖は認められなかった。一方、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体においては骨髄中のヒト赤血球および顆粒球／マクロファージ系の前駆細胞の数が有意に高かった（実施例１４）。このことは、ヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体がヒト細胞に選択的にシグナルを入れ、巨核球系のみならず、他系列の細胞の生着も促進できる可能性を示唆している。

本発明に係るヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物により治療される状態は、一般には、存在する巨核球／血小板の欠乏または将来において予期または予想される巨核球／血小板の欠乏（例えば、計画されている手術または血小板供与によるもの）を伴う状態である。そのような状態は、インビボにおける活性Ｍｐｌリガンドの（一時的または永久的な）欠乏により生じうる。したがって本発明の組成物は、血小板欠乏状態即ち血小板減少症の治療を要する患者において血小板減少症を予防的または治療的な治療するために利用可能である。さらに、汎血球減少を長期間に渡って伴う造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植）後の血球回復のための治療を要する患者において、汎血球減少症を予防的または治療的な治療をするためにも利用可能であ

る。

血小板減少症（血小板欠乏症）は、化学療法および種々の薬物での他の療法、放射線療法、手術、不慮の出血、および他の具体的な病態を含む種々の理由により生じうる。血小板減少症を伴い本発明に従い治療されうる典型的な具体的な病態としては以下のものが挙げられる：無形成貧血；特発性または免疫血小板減少症（ＩＴＰ）、例えば乳癌に伴う特発性血小板減少性紫斑病；ＨＩＶに伴うＩＴＰおよびＨＩＶに関連した血栓性血小板減少性紫斑病；血小板減少症を引き起こす転移性腫瘍；全身性エリテマトーデス、例えば新生児ループス症候群脾腫；ファンコーニ症候群；ビタミンＢ１２欠乏症；葉酸欠乏症；メイーヘグリンの異常；ウィスコットーアルドリッチ症候群；慢性肝疾患；血小板減少症に関連した骨髄形成異常症候群；発作性夜間ヘモグロビン尿症；Ｃ７Ｅ３　Ｆａｂ（Ａｂｃｉｘｉｍａｂ）療法後の急性深部血小板減少症；同種免疫血小板減少症、例えば母性同種免疫血小板減少症；抗リン脂質抗体および血栓症に関連した血小板減少症；自己免疫血小板減少症；薬物により誘発された免疫血小板減少症、例えばカルボプラチンにより誘発された血小板減少症、ヘパリンにより誘発された血小板減少症；胎児血小板減少症；妊娠血小板減少症；ヒュージー症候群；ルポイド血小板減少症；不慮の及び／又は大量の失血；骨髄増殖性異常症；悪性疾患を有する患者における血小板減少症；血栓性血小板減少紫斑病、例えば癌患者において血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒症性症候群として現れる血栓性細小血管症；自己免疫性溶血性貧血；潜在性空腸憩室穿孔；真正赤血球系無形成症；自己免疫血小板減少症；流行性（ｅｐｉｄｅｍｉｃａ）腎障害；ラファンピシンに関連した急性腎不全；Ｐａｒｉｓ－Ｔｒｏｕｓｓｅａｕ血小板減少症；新生児同種免疫血小板減少症；発作性夜間ヘモグロビン尿症；胃癌における血液学的変化；小児における溶血性尿毒症性症候群；Ａ型関連ウイルスを含むウイルス感染に関連した血液学的徴候およびＣＭＶに関連した血小板減少症。また、ある種のエイズ治療は血小板減少症を引き起こす（例えば、ＡＺＴ）。また、ある種の創傷治癒障害は、血小板数の増加が有益であろう。なお上記疾患においては、血小板減少のみならず、その他の血球減少を伴う疾患も存在する。

予想される血小板の欠乏（例えば、将来の手術によるもの）に対して、血小板が必要となる前に数日から数時間にわたり有効成分としての本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。緊急の状況（例えば、不慮の及び大量の失血）では、血液または精製血小板と共に本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。あるいは、汎血球の欠乏（例えば、臍帯血移植によるもの）に対しても、有効成分としての本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。

特に好ましい治療対象としては、（１）特発性血小板減少性紫斑病もしくは肝疾患にともなって起こる血小板減少症、（２）癌化学療法、再生不良性貧血、骨髄異形性症候群（ＭＤＳ）、骨髄移植もしくは臍帯血移植にともなって起こる血小板減少症および／または汎血球減少症を挙げることができる。

本発明のヒトｃ－ＭＰＬに対するアゴニスト抗体はまた、血小板および／または巨核球および関連細胞の生存能または保存寿命を維持するのに有用で有り得る。したがって、そのような細胞を含有する組成物中に有効量を含有させるのが有用であろう。

本発明にかかるヒトｃ－ＭＰＬに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物は、注射用または経口、鼻、経皮または他の投与形態のためのものであってもよい。それらには、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、鞘内、眼内、延髄後方、肺内（例えば、エアゾール化薬）または皮下注射（長期にわたる放出のためのデポ投与を含む）、舌下、肛門、膣または外科的移植、例えば脾漿膜下、脳または角膜内の埋め込みによる投与が含まれる。該治療は、単回投与または一定期間にわたる複数回の投与よりなるものであってもよい。一般には、本発明にかかるヒトｃ－ＭＰＬに対するアゴニスト抗体の有効量と医薬上許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、佐剤および／または担体とを含む医薬組成物が本発明に含まれる。そのような組成物は、種々のバッファー含有物（例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨおよびイオン強度の希釈剤；添加物、例えば界面活性剤および可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔ

ｅ８０）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、Ｔｈｉｍｅｒｓｏｌ、ベンジルアルコール）および増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの重合体化合物の粒子状製剤内またはリポソーム内に該物質が封入されたものを含む。所望により、医薬ビヒクル、賦形剤または媒体として働く更に他の医薬上許容される液体、半固体または固体希釈剤を含んでいてもよい。それらには、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート、ステアリン酸マグネシウム、メチル－およびプロピルヒドロキシベンゾアート、デンプン、スクロース、デキストロース、アラビアゴム、リン酸カルシウム、鉱油、カカオ脂およびテオブロマの油が含まれるが、これらに限定されるものではない。該組成物は、液体形態または乾燥粉末（例えば、凍結乾燥形態）として製造することができる。移植可能な徐放製剤、および経皮製剤も意図される。

上記の状態の治療方法にかかわる投与計画は、薬物の作用を改変する種々の要因（例えば、患者の年齢、状態、体重、性別および食事、いずれかの感染の重症度、投与時間ならびに他の臨床的要因）を考慮して担当医師により決定されるであろう。一般には、該用量は、１日当たり本発明抗体１００μｇ～１ｍｇ／ｋｇ体重、好ましくは１０～１００μｇ／ｋｇ、より好ましくは１～１０μｇ／ｋｇであり、これらを、１日量で、あるいはより長い又はより短い間隔で（例えば、１日おき、１週間に２回、毎週、または毎日２回または３回）同等量で投与する。

また、本発明にかかるヒトｃ－ＭＰＬに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物は、単独で又は他のサイトカイン、可溶性Ｍｐｌ受容体、造血因子、インターロイキン、増殖因子と組合せて、血小板の欠乏および他の症状により特徴づけられる病態の治療において使用することができる。造血の一般的な刺激因子（例えば、ＩＬ－３またはＧＭ－ＣＳＦ）と組合せて、いくつかの形態の血小板減少症を治療するのに有用であると予想される。また、他の巨核球刺激因子、すなわちｍｅｇ－ＣＳＦ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、白血病阻害因子（ＬＩＦ）、オンコスタチンＭ（ＯＳＭ）または巨核球刺激活性を有する他の分子を、Ｍｐｌリガンドと共に使用することができる。そのような共投与のための追加的な代表的なサイトカインまたは造血因子には、ＩＬ－１アルファ、ＩＬ－１ベータ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ５、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、コロニー刺激因子－１（ＣＳＦ－１）、Ｍ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、ＥＰＯ、インターフェロン－アルファ（ＩＦＮ－アルファ）、コンセンサスインターフェロン、ＩＦＮ－ベータ、ＩＦＮ－ガンマ、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、アンジオポエチン、例えばＡｎｇ－１、Ａｎｇ－２、Ａｎｇ－３、Ａｎｇ－４、Ａｎｇ－Ｙ、ヒトアンジオポエチン様ポリペプチド、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、アンジオゲニン、骨形成因子（ｂｏｎｅ　ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎ）－１、骨形成因子－２、骨形成因子－３、骨形成因子－４、骨形成因子－５、骨形成因子－６、骨形成因子－７、骨形成因子－８、骨形成因子－９、骨形成因子－１０、骨形成因子－１１、骨形成因子－１２、骨形成因子－１３、骨形成因子－１４、骨形成因子－１５、骨形成因子受容体ＩＡ、骨形成因子受容体ＩＢ、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子α、サイトカイン誘導性好中球走化因子１、サイトカイン誘導性好中球走化因子２α、サイトカイン誘導性好中球走化因子２β、β内皮細胞増殖因子、エンドセリン１、上皮増殖因子、上皮由来好中球誘引物質、繊維芽細胞増殖因子４、繊維芽細胞増殖因子５、繊維芽細胞増殖因子６、繊維芽細胞増殖因子７、繊維芽細胞増殖因子８、繊維芽細胞増殖因子８ｂ、繊維芽細胞増殖因子８ｃ、繊維芽細胞増殖因子９、繊維芽細胞増殖因子１０、酸性繊維芽細胞増殖因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α１、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α２、成長関連タンパク質（ｇｒｏｗｔｈ　ｒｅｌａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）、成長関連タンパク質α、成長関連タンパク質β、成長関連タンパク質γ、ヘパリン結合性上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子Ｉ、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子ＩＩ，インスリン様増殖因子結合タ

ンパク質、角質細胞増殖因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子受容体α、神経成長因子、神経成長因子受容体、ニューロトロフィン－３、ニューロトロフィン－４、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子２、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子Ａ鎖、血小板由来増殖因子ＡＡ、血小板由来増殖因子ＡＢ、血小板由来増殖因子Ｂ鎖、血小板由来増殖因子ＢＢ、血小板由来増殖因子受容体α、血小板由来増殖因子受容体β、プレＢ細胞増殖刺激因子、幹細胞因子受容体、ＴＮＦ（ＴＦＮ０、ＴＮＦ１、ＴＮＦ２を含む）、トランスフォーミング増殖因子α、トランスフォーミング増殖因子β、トランスフォーミング増殖因子β１、トランスフォーミング増殖因子β１．２、トランスフォーミング増殖因子β２、トランスフォーミング増殖因子β３、トランスフォーミング増殖因子β５、潜在（ｌａｔｅｎｔ）トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質Ｉ、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質ＩＩ、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質ＩＩＩ、腫瘍壊死因子受容体Ｉ型、腫瘍壊死因子受容体ＩＩ型、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター受容体、血管内皮増殖因子、ならびにそれらのキメラタンパク質が含まれる。

したがって、本発明にかかるヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物の投与（成熟巨核球の数を増加させるためのもの）は、血小板の産生を刺激する特に有効な手段であると予想される。さらに造血幹細胞の産生を刺激することにおいても有用な手段であると予想される。前記で列挙した用量は、該治療用組成物中のそのような追加的な成分を補償するように調節されるであろう。治療された患者の経過は、通常の方法によりモニターすることができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【０００６】

［実施例１］　抗原の調製

１－１　ヒトｃ－Ｍｐｌ発現細胞の作製

抗原タンパク質を発現する細胞株を免疫に用いる場合、一般的に発現量が高いほど抗体作製には有利である。ヒトｃ－Ｍｐｌ発現細胞株としては、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株が知られているが、これらの細胞株のｃ－Ｍｐｌ発現量は細胞あたり数千分子と低く、抗原には不向きである。実際、マウス造血系細胞株であるＦＤＣＰ２にヒトｃ－Ｍｐｌを導入した発現株ＦＤＣＰ－ｈＭｐｌ（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．１９９６　Ｏｃｔ　２１；３９５（２－３）：２２８－３４．参照）をヒト抗体産生マウス（ＫＭマウス^{TM}）に免疫した場合、抗体価上昇が不十分であり、ｈＭｐｌ特異的なヒト抗体を得ることができなかった。また、ヒト巨核球系細胞株を抗原として用いる場合、他の膜分子に対する抗体も誘導されるため、ｃ－Ｍｐｌ特異的な抗体を効率良く誘導するためには、マウス細胞株、しかも可能な限りＭＨＣ適合した細胞株を宿主に、ヒトｃ－Ｍｐｌを導入した高発現株を用いるのが望ましい。そこで、ヒトｃ－Ｍｐｌ（ｈＭｐｌ）高発現株を作製するために、ｈＭｐｌ発現ベクターを以下の通り作製し、かつ２種類のマウス細胞株（Ｌ９２９およびＦＭ３Ａ）へ導入を行った。

更に、ｈＭｐｌにはリガンド非依存性に恒常的にアゴニストシグナルを伝達する変異型受容体が報告されている（５０８番目ＴｒｐがＳｅｒに変換している変異体、Ａｂｅ　Ｍら、Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２００２　Ａｕｇ；１６（８）：１５００－１５０６）が、このような変異体は野生型とは立体構造が異なることが予想される。このような恒常活性型変異体に親和性が高い抗体は、強力なアゴニスト活性を示す可能性がある。そこで、恒常活性型変異体（以下ｈＭｐｌ－Ｓｅｒ）の発現ベクターも作製し、発現細胞を作製して免疫に用いた。

１）抗ヒトｃ－Ｍｐｌ（ｈＭｐｌ）発現ベクターの調製

ｈＭｐｌの全長ｃＤＮＡを保持するプラスミドＤＮＡであるｈｕｍｐｌ－Ｐａｓ１２（Ｂａｒｔｌｅｙ　ＴＤら、Ｃｅｌｌ　１９９４　Ｊｕｌ　１；７７（７）：１１１７－１１２４．或はＭｏｒｉｔａ　Ｈら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．１９９６　Ｏｃｔ　２１；３９

５（２－３）：２２８－２３４．）のＤＮＡを鋳型としてｈＭｐｌのコーディング領域全域を増幅するＰＣＲ反応を実施した。プライマーとして、末端に連結のための制限酵素部位（５’末側ＥｃｏＲＩ、３’末側ＸｂａＩ）を付加するようにデザインした、Ｍｐｌ＿Ｆ１及びＭｐｌ＿Ｒ２を用いて、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡績（株）製、日本）によるＰＣＲで増幅した。以下、実施例中のＰＣＲの反応温度調節は、ジーンアンプＰＣＲシステム９７００（（株）パーキンエルマー・ジャパン社製）を使用した。反応温度条件としては、９４℃の初期温度で５分間の加熱後、９８℃／１０秒間と６８℃／３分間のサイクルを３０回反復し、最後に７２℃／７分間加熱した。増幅したＰＣＲ断片は、エタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、メンブランを用いるＤＮＡ精製キットであるＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（キアゲン社製）にて精製した。精製したＤＮＡ断片をｐＣＲ４Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。ＤＮＡ塩基配列決定のためのプライマーとして、Ｍ１３－２０ＦＷ及びＭ１３ＲＶを用いた。挿入部分のＤＮＡ塩基配列解析を行い、ｈＭｐｌの配列（ＧｅｎＢａｎｋ ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ：Ｍ９０１０２）と相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドＤＮＡを選択した。次に、ｈＭｐｌの配列を含むプラスミドＤＮＡを精製した後、制限酵素ＥｃｏＲＩとＸｂａＩで消化して、アガロースゲル電気泳動で約２ｋｂ弱のＤＮＡを回収し精製した。他方、ヒトＥＦプロモーターとブラストサイジン（Ｂｓｄ）選択マーカーを有する発現ベクターであるｐＥＦ６／Ｍｙｃ－Ｈｉｓ（インビトロジェン（株）社製）、及び、ＣＭＶプロモーターとネオマイシン（Ｎｅｏ）選択マーカーを有するｐＥＧＥＰ－Ｎ１ベクター（ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）についても、同様に制限酵素ＥｃｏＲＩ、とＸｂａＩでの消化処理を行った後、脱リン酸化のためにＡｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（Ｅ．ｃｏｌｉ Ｃ７５）（タカラバイオ（株）、日本）で処理した後に、アガロースゲル電気泳動とＤＮＡ精製キットでＤＮＡを回収した。精製したｈＭｐｌの全領域ＤＮＡ断片を、それぞれの発現ベクターＤＮＡにＴ４ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅを用いてライゲーションして、大腸菌ＤＨ１０Ｂへ導入し、それぞれ形質転換体を得た。インサートＤＮＡを含む形質転換体のプラスミドＤＮＡについてＤＮＡ塩基配列を解析して、ｈＭｐｌの全長ｃＤＮＡが挿入されたｐＥＦ－ＭＰＬ６３５及びｐＣＭＶ－ＭＰＬ６３５を取得した。

Mpl_F1：5’-AGAGAGAGAG GAATTCGCCA CCATGCCCTC CTGGGCCCTC TT-3’（配列番号12）

Mpl_R2：5’- AGAGAGAGAG CGGCCGCTCA AGGCTGCTGC CAATAGCTTA GTG -3’（配列番号13）

M13-20FW: 5’-GTAAAACGACGGCCAGTG-3’（配列番号14）

M13RV：5’-CAGGAAACAGCTATGAC-3’（配列番号15）

２）恒常活性型ヒトｃ－Ｍｐｌ（ｈＭｐｌ－Ｓｅｒ）発現ベクターの調製

ＴＰＯ非依存性に細胞内のシグナル活性化が報告されているｈＭｐｌ変異体（５０８番目ＴｒｐがＳｅｒに変換している変異体、Ａｂｅ Ｍら、Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２００２ Ａｕｇ；１６（８）：１５００－１５０６）の発現ベクターを作製した。５０８番目のアミノ酸残基をコードするコドンを変更（ＴＧＧ→ＴＣＧ）するために、ｐＥＦ－ＭＰＬ６３５のＤＮＡを鋳型として、ＧｅｎｅＥｄｉｔｏｒ™ ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（プロメガ社）を用いた部位特異的変異導入法を実施した。変異導入用オリゴヌクレオチド（５’末端リン酸化済み）としては、Ｍｕｔ＿ＭｐｌＳｅｒ５０８を用いた。目的の変異導入用オリゴヌクレオチド

と上記キット付属のＳｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅを鋳型ＤＮＡとアニーリングさせて変異導入鎖を合成した後、ＧｅｎｅＥｄｉｔｏｒ™ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｉｘ存在下では変異体のみが増殖することを利用して変異体を選択した。より具体的には、ｄｓＤＮＡテンプレートをアルカリ条件下（０．２Ｍ ＮａＯＨ、０．２ｍＭＥＤＴＡ（最終濃度））室温で５分間インキュベートした後、２Ｍ酢酸アンモニウム（ｐＨ４．６）を１０分の１容量加えて中和してからエタノール沈殿により回収した。アルカリ変性処理した鋳型ＤＮＡに、変異導入用オリゴヌクレオチドと新しい抗生物質耐性獲得用Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（５’末端リン酸化）、及び、キット添付のアニーリングバッファーを加えた後、７５℃で５分間保温し、３７℃にゆっくり下げることによりアニーリングを行なった。次に、変異鎖の合成と連結のために、キット付属のＳｙｎｔｈｅｓｉｓ １０×ｂｕｆｆｅｒ、Ｔ４ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、及びＴ４ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅを加えて、３７℃で９０分反応を行なった。ＧｅｎｅＥｄｉｔｏｒ™Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｉｘ存在下でコンピテントセルＢＭＨ７１－１８ｍｕｔＳに形質転換して培養した形質転換体大腸菌よりプラスミドＤＮＡを調製し、更にそのＤＮＡによりコンピテントセルＪＭ１０９を形質転換後、ＧｅｎｅＥｄｉｔｏｒ™Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｉｘを含むＬＢプレートに播種した。プレートに生じた形質転換体を培養して、プラスミドＤＮＡのＤＮＡ塩基配列を解析して、５０８番目のアミノ酸が変換（ＴｒｐからＳｅｒ）したｈＭｐｌを発現するｐＥＦ－ＭＰＬ６３５－Ｓｅｒベクターを取得した。

Mut_MplSer508：5’-CTGCTGCTGC TGAGGTCGCA GTTTCCTGCA CACTAC-3’（配列番号16）

３）全長ヒトｃ－Ｍｐｌ発現Ｌ９２９細胞の作製

作製したｐＥＦ－ＭＰＬ６３５ベクター（１μｇ）を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより購入）およびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＰＬＵＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより購入）試薬と混合し、さらに無血清Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ）培地と混合した。混合液を１．５ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで６－ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅに培養したＬ９２９細胞に添加し、３時間培養することで細胞にＤＮＡを導入した。１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）添加ＤＭＥＭ培地にて一晩培養し、翌日より、培地に１０μｇ／ｍＬ Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより購入）を加えて薬剤耐性細胞を選抜した。その後、抗ｃ－Ｍｐｌ抗体を用いたＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ（ＦＡＣＳ）法にてｃ－Ｍｐｌ発現細胞を単離し、全長ヒトｃ－Ｍｐｌ発現Ｌ９２９細胞株（以下、Ｌ９２９－ｈＭｐｌ）を樹立した。ＦＡＣＳはＦＡＣＳ－Ｖａｎｔａｇｅ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ社製）によって行った。選抜後は５μｇ／ｍＬ Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ，１０％ＦＢＳ添加ＤＭＥＭ培地にて培養、維持した。

４）全長ヒトｃ－Ｍｐｌ発現ＦＭ３Ａ細胞の作製

上記３）と同様の方法でｐＥＦ－ＭＰＬ６３５ベクターをＦＭ３Ａ細胞に導入し、全長ヒトｃ－Ｍｐｌ発現ＦＭ３Ａ細胞株（以下、ＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ）を樹立した。５μｇ／ｍＬ Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ，１０％ＦＢＳ添加Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）培地にて培養、維持した。

５）恒常活性型ヒトＭｐｌ発現ＦＭ３Ａ細胞作製

上記、ｐＥＦ－ＭＰＬ６３５－Ｓｅｒベクターを、３）と同様の方法で、ＦＭ３Ａ細胞に導入し、ｈＭｐｌ－Ｓｅｒ発現ＦＭ３Ａ細胞株（以下、ＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ－Ｓｅｒ）を樹立した。５μｇ／ｍＬ Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ，１０％ＦＢＳ添加ＲＰＭＩ培地にて培養、維持した。

１－２ 可溶化ヒトｃ－Ｍｐｌ組換えタンパク質の作製

ヒトｃ－Ｍｐｌの細胞膜貫通領域および細胞内領域を欠失させた、下記配列の可溶化型

ヒトｃ－Ｍｐｌをコードするｄｎａを発現ベクターｐＥＡＫ８（ＥｄｇｅＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓ社製）に結合し、トランスフェクタム試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ社より入手可能）にてＨｅｋ２９３細胞に導入した。安定発現株を選択後、その培養上清を抗Ｍｐｌ抗体カラムにて精製し、可溶化型ヒトｃ－Ｍｐｌ組換えタンパク質（以下ｓｏｌｕｂｌｅ　Ｍｐｌ－ｘ、ｓＭｐｌ－ｘと略記）を調製した。

NH_2-MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFWDEEEAAPSGTYQLLYA

YPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIK

AMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCA

QPTMPWQDGPKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGSWSLPVTVDLPGDA

VALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS

RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYT

GEGHQDWKVLEPPLGARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW-COOH（配列番号17）

［実施例２］　モノクローナル抗体の作製

本発明の抗体は、遺伝子改変によってヒト抗体を産生する能力を持つヒト抗体産生マウス（ＫＭマウス^{TM}）を免疫し、モノクローナル抗体を作製することで得られた。ＫＭマウスは、内在性マウスイムノグロブリン（Ｉｇ）重鎖及びマウスκ軽鎖を欠損しており、かつ、ヒトＩｇ重鎖遺伝子を含む１４番染色体断片（ＳＣ２０）及びヒトＩｇκ鎖トランスジーン（ＫＣｏ５）を同時に保持する。即ち、ＫＭマウスはヒト抗体を産生する能力を持ち、マウスＩｇ重鎖およびκ鎖を欠損したマウスである。このマウスはヒトＩｇ重鎖遺伝子座を持つ系統Ａのマウスと、ヒトＩｇκ鎖トランスジーンを持つ系統Ｂのマウスとの交配により作製される。系統Ａは、内因性Ｉｇ重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な１４番染色体断片（ＳＣ２０）を保持するマウス系統（Ｔｏｍｉｚｕｋａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．，２０００　Ｖｏｌ９７：７２２参照）である。また、系統Ｂは内在性マウスＩｇ重鎖及びκ軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒトＩｇκ鎖トランスジーン（ＫＣｏ５）を保持するマウス系統（Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１９９６　Ｖｏｌ１４：８４５参照）である。

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、公知の方法によって行った（単クローン抗体実験操作入門　安東民衛ら著作、講談社（東京、日本）発行１９９１参照）。

１）免疫

免疫原としてのヒトｃ－Ｍｐｌは、実施例１で作製したＬ９２９－ｈＭｐｌ細胞、ＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞、恒常活性型ｃ－Ｍｐｌ発現ＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ－Ｓｅｒ細胞、ｓＭｐｌ－ｘ組換えタンパク質を用いた。被免疫動物は、実施例２で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウス使用し、下記の免疫方法で行った。

免疫方法１：　９週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例１で作製したＬ９２９－ｈＭｐｌ細胞（５×１０^{6}細胞）をＲｉｂｉアジュバンドと混合し、腹腔内に初回免疫した。初回免疫以降、一週間ごとに、同細胞（２×１０^{6}細胞）を、インターロイキン６（ＩＬ－６）（５μｇ）と同時に、尾静脈経由で７回免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得３日前に同細胞を尾静脈経由で最終免疫した。

免疫方法２：　９週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例１で作製したＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ－Ｓｅｒ細胞（５×１０^{6}細胞）に紫外線照射し、Ｒｉｂｉアジュバンドを加え腹腔内に初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞（５×１０^{6}細胞）を腹腔内投与で、一週間ごとに７回免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得３日前に、実施例１で作製したＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞（２×１０^{6}細胞）をＩＬ－６（５μｇ）を加えて、尾静脈経由で

最終免疫した。

免疫方法３：　９週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例１で作製したｓＭｐｌ－ｘ組換えタンパク質（１０μｇ）を、完全フロイントアジュバンド（ＣＦＡ）と混合して皮下投与で初回免疫した。２回目から５回目の免疫は、一週間に一度、ｓＭｐｌ－ｘ組換えタンパク質（５μｇ）を不完全フロイントアジュバンド（ＩＦＡ）と混合して皮下投与で免疫した。６回目から８回目の免疫では、Ｌ９２９－ｈＭｐｌ細胞（５×１０^{6}細胞）を腹腔内に免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得３日前に、ｓＭｐｌ－ｘ組換えタンパク質（５μｇ）およびＩＬ－６（５μｇ）を、尾静脈経由で最終免疫した。

２）ハイブリドーマ作製

最終免疫の３日後にマウスから脾臓及び／又はリンパ節を外科的に取得し、３５０ｍｇ／ｍｌ炭酸水素ナトリウム、５０単位／ｍｌペニシリン、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシンを含む無血清ＤＭＥＭ培地１０ｍｌ中に入れ、メッシュ（セルストレイナー：ファルコン社製）上でスパーテルを用いてつぶした。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して細胞を沈澱させた後、この細胞を無血清ＤＭＥＭ培地で２回洗浄してから、無血清ＤＭＥＭ培地に懸濁して細胞数を測定した。一方、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地にて、３７℃、５％炭酸ガス存在下で細胞濃度が１×１０^{8}細胞／ｍｌを越えないように培養したミエローマ細胞ＳＰ２／０（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１５８１）を同様に無血清ＤＭＥＭ培地で洗浄し、無血清ＤＭＥＭ培地に懸濁して細胞数を測定した。回収した細胞の懸濁液とマウスミエローマ懸濁液とを細胞数５：１で混合し、遠心後、上清を完全に除去した。このペレットに、融合剤として５０％（ｗ／ｖ）ポリエチレングリコール１５００（ベーリンガーマンハイム社製）１ｍｌを、ピペットの先で撹拌しながらゆっくり添加した後、予め３７℃に加温しておいた無血清ＤＭＥＭ培地１ｍｌを２回に分けてゆっくり添加し、さらに７ｍｌの無血清ＤＭＥＭ培地を添加した。遠心後、上清を除去して得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。ハイブリドーマの選択は、１０％のウシ胎児血清（Ｆｅｔａｌ　Ｃａｌｆ　Ｓｅｒｕｍ、ＦＣＳ）とヒポキサンチン（Ｈ）、アミノプテリン（Ａ）、チミジン（Ｔ）（以下「ＨＡＴ」という。：シグマ社製）を含有するＤＭＥＭ培地中で培養することによって行った。さらに、１０％ＦＣＳとＨＴ（シグマ社製）とを含有するＤＭＥＭ培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、９６穴マイクロタイタープレート（ベクトンディッキンソン社製）中で行った。抗ヒトｃ－Ｍｐｌヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択（スクリーニング）及び各々のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、実施例４に記載のフローサイトメトリー、あるいは実施例５に記載のＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた細胞増殖アッセイによって行った。アゴニスト抗体の活性評価系として、ＢａＦ３等のマウス細胞株にヒトＭｐｌを発現させ、細胞増殖アッセイを行うことができる（Ｏｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２００５　Ｊａｎ　１５；１０５（２）：５６２－６．）が、そのような細胞の反応が、ヒト細胞の反応を反映しているとは限らない。ＵＴ７／ＴＰＯはヒト由来細胞株であるため、これをスクリーニングに用いることで、よりヒト細胞に強い活性を持つ抗体を選抜し易いと考えられる。

スクリーニングの結果、抗ヒトＭｐｌアゴニスト抗体産生ハイブリドーマとして、免疫方法１によるハイブリドーマ７－１０、免疫方法２によるハイブリドーマ４－４９、免疫方法３によるハイブリドーマ６－４－５０，６－５－２の４クローンが選抜された。また、非アゴニスト抗体産生ハイブリドーマとして２－３５（免疫方法１により得たもの）をコントロールとして選抜した。

［実施例３］　ハイブリドーマ培養上清からの精製抗体調製

ハイブリドーマの培養上清からの抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体の精製は以下の方法で行った。抗体を含む培養上清をｒｍｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ（アマシャムファルマシアバイオテク社製）及び０．８×４０ｃｍカラム（バイオラッド社製）を用い、吸着緩衝液としてＰＢＳ、溶出緩衝液として０．０２Ｍグリシン緩衝液（ｐＨ３）を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ９．０）を添加してｐＨ７．２付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜（１００００カット、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ

Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）を用いてＰＢＳに置換し、孔径０．２２μｍのメンブランフィルターＭＩＬＬＥＸ－ＧＶ（ミリポア社製）でろ過滅菌し、精製抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体を得た。精製抗体の濃度は２８０ｎｍの吸光度を測定し、１ｍｇ／ｍｌを１．４ＯＤとして算出した。

抗ヒトｃ－Ｍｐｌモノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。

まず、抗体産生ハイブリドーマを１０ｎｇ／ｍｌ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＩＬ－６（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）、１０％ Ｌｏｗ ＩｇＧ Ｆｅｔａｌ Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ（ＨｙＣｌｏｎｅ社製）含有ｅＲＤＦ培地（極東製薬社製）に馴化した。この馴化したハイブリドーマを凍結保存した。次に、その一部を、ウシインシュリン（５μｇ／ｍｌ、ギブコビーアールエル社製）、ヒトトランスフェリン（５μｇ／ｍｌ、ギブコビーアールエル社製）、エタノールアミン（０．０１ｍＭ、シグマ社製）、亜セレン酸ナトリウム（２．５ｘ１０$^{-5}$ｍＭ、シグマ社製）、１０ｎｇ／ｍｌ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＩＬ－６（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）、１％ Ｌｏｗ ＩｇＧ Ｆｅｔａｌ Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ（ＨｙＣｌｏｎｅ社製）含有ｅＲＤＦ培地（極東製薬社製）に馴化した。フラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が９０％になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、１０μｍと０．２μｍのフィルター（ゲルマンサイエンス社製）に供し、きょう雑物を除去した。

［実施例４］ フローサイトメトリーによる抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体の結合活性評価

ハイブリドーマ培養上清もしくは精製抗体を用いたフローサイトメトリーによって、抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体の結合活性を測定した。手順は以下の通りである。細胞はＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞もしくはヒトＭｐｌ発現ＦＤＣＰ２細胞（ＦＤＣＰ－ｈＭｐｌ）（ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．１９９６ Ｏｃｔ ２１；３９５（２－３）：２２８－３４．参照）を用いた。

反応あたり４ｘ１０^{5}個の細胞を５０μＬのＦＡＣＳ ｓｔａｉｎｉｎｇ ｍｅｄｉｕｍ（２％ＦＢＳ，０．１％ＮａＮ３，１ｍＭ ＥＤＴＡ ｉｎ ＰＢＳ）に懸濁し、５０μＬのハイブリドーマの培養上清もしくは精製ヒト抗体（終濃度０．１－１μｇ／ｍＬ）を加え、氷上にて３０分間反応させた。ＦＡＣＳ ｓｔａｉｎｉｎｇ ｍｅｄｉｕｍによる洗浄後、二次抗体であるＲ－ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ（ＲＰＥ）標識ヤギ抗ヒトＩｇγ Ｆ（ａｂ’）抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製Ｃａｔ＃２０４３－０９）を加え、再び氷上で３０分遮光反応させた後、再び洗浄した。細胞をＰｒｏｐｉｄｉｕｍ Ｉｏｄｉｄｅ（ＰＩ）を加えたＦＡＣＳ ｓｔａｉｎｉｎｇ ｍｅｄｉｕｍに懸濁し、解析を行った。解析はＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ社製）にて行った。

図１に各抗体の精製抗体を用いたフローサイトメトリーの結果を示す。各抗体はＦＤＣＰ－ｈＭｐｌ細胞に結合したが、その親細胞であるＦＤＣＰ２細胞（ＦＤＣＰ ｐａｒｅｎｔ）には結合しなかった。従って、これらの抗体はヒトＭｐｌ特異的に結合していることが示された。

［実施例５］ ＵＴ７／ＴＰＯ細胞を用いた抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体のアゴニスト活性評価

ハイブリドーマ上清もしくは精製抗体を用いて、ＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイを行い、アゴニスト活性を評価した。ＵＴ７／ＴＰＯ細胞はＴＰＯ依存性のヒト巨核球系細胞株である（Ｏｚａｋｉ Ｋ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．１９９８ Ｄｅｃ １５；９２（１２）：４６５２－６２．参照）。通常は１０％ＦＢＳ，５ｎｇ／ｍＬ ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ添加Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（ＩＭＤＭ）で培養、維持した。細胞増殖アッセイの手順は以下の通りである。

（１）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞培養液を５０ｍＬチューブに移し、遠心分離（１，５００ｒｐｍ，５ｍｉｎ，４℃）により細胞をペレットにした。培地を除き、サイトカイン非添加，１０％ＦＢＳ添加ＩＭＤＭ培地（以下、増殖アッセイ用培地）でペレットを懸濁した。再び遠心し、新しい増殖アッセイ用培地で懸濁した。遠心、懸濁をもう一度繰り返した。

（２）上記１．で増殖アッセイ用培地に懸濁した細胞を３７℃，５％CO_2条件下で６時間培養した。

（３）培養後、細胞を遠心してペレットにし、増殖アッセイ用培地にて懸濁した。このとき、細胞濃度を６×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬにあわせ、細胞懸濁液を、各ウェル５０μＬで９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅに播いた。

（４）次に、ハイブリドーマ培養上清１０μＬに、増殖アッセイ用培地４０μＬを加え、各ウェルに添加する。精製抗体の場合は、増殖アッセイ用培地５０μＬに検体を終濃度の２倍の濃度で加え、各ウェルに添加した。

（５）３７℃，５％CO_2にて、４８時間培養する。

（６）ＷＳＴ－８試薬（同仁化学研究所社製）を１０μＬ／ｗｅｌｌで添加し、２時間培養する。

（７）吸光マイクロプレートリーダー（ＴＥＣＡＮ社製ＳＵＮＲＩＳＥ　ＲＡＩＮＢＯＷ）にて各ウェルの吸光度を測定する。（測定波長４５０ｎｍ，参照波長６００ｎｍ以上）

図２に７－１０（図２Ａ），４－４９（図２Ｂ），６－４－５０（図２Ｃ），６－５－２（図２Ｄ）各精製抗体を用いたＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイにおける増殖曲線を示す。また、スクリーニングの結果得られた抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体のサブクラス、活性の強さ（ＵＴ７／ＴＰＯ細胞増殖アッセイにおける５０％有効濃度（ＥＣ５０）、最大活性（Ｍａｘ））、各抗体が得られた実施例２に記載の免疫方法を表２に示す。

【表２】

表２

ハイブリドーマ	サブクラス	UT7/TPO (EC50)	UT7/TPO(Max)	免疫方法
2-35 非アゴニスト	IgG1	-	-	1
7-10	IgG1	++	>90%	1
4-49	IgG1	++	>80%	2
6-4-50	IgG1	+	>80%	3
6-5-2	IgG1	+	>50%	3
PEG-rHuMGDF	-	0.001-0.01nM	100%	-

+: EC_{50} 1-10nM
++: EC_{50} 0.1-1nM

［実施例６］　コロニーアッセイ

ヒト臍帯血由来ＣＤ３４＋細胞を用いたＣＦＵ－Ｍｋコロニー形成アッセイを行い、精製抗体のヒトプライマリー細胞に対する作用を検討した。アッセイにはＭｅｇａＣｕｌｔ^{TM}－Ｃ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製Ｃａｔ＃０４９７２）を使用した。手順は以下の通りである。

（１）検体を含んだ０．１５ｍＬのＩＭＤＭに、０．８５ｍＬのＭｅｇａＣｕｌｔ^{TM}－Ｃ培地を加え１ｍＬとした。

（２）ヒト臍帯血より調製したＣＤ３４＋細胞を１．１ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度で、ＩＭＤＭに懸濁し、上記１．の培地が入ったチューブに０．０５ｍＬずつ添加した。

（３）細胞を加えた各チューブをボルテックスで攪拌し、０．６ｍＬの氷冷したコラーゲン液を加え、再びボルテックスで攪拌した。

（４）上記３．までの細胞、検体混合液をチャンバースライドの各ウェルに０．７５ｍＬずつ添加した。

（５）チャンバースライドを、１００ｍｍペトリディッシュ中に入れた。乾燥を防ぐために、３ｍＬの精製水を入れた３５ｍｍペトリディッシュを同じ１００ｍｍペトリディッ

シュ中に入れた。
（６）チャンバースライドが入ったペトリディッシュをインキュベーター中に静置し、３７℃，５％CO_2条件下で１０～１２日間培養した。
（７）培養後、固定液（メタノール：アセトン＝１：３）にて固定した。
（８）抗ヒトＣＤ４１抗体による免疫染色を行い、ＣＦＵ－Ｍｋコロニーを検出した。顕微鏡下でコロニー数をカウントし、各検体のＣＦＵ－Ｍｋコロニー形成能を比較した。
図３にコロニーアッセイの結果を示した。７－１０＿ＩｇＧ１，４－４９＿ＩｇＧ１によってコロニー形成が誘導された。
［実施例７］　抗体遺伝子クローニングと配列決定
組み換え抗体を作製するために、選抜された抗ヒトｃ－Ｍｐｌアゴニスト抗体産生ハイブリドーマから抗体遺伝子、具体的には重鎖（Ｈ鎖）をコードするヒトＩｇγｃＤＮＡおよび軽鎖（Ｌ鎖）をコードするヒトＩｇκ　ｃＤＮＡを単離し、配列を決定した。
１）各モノクローナル抗体のｃＤＮＡ合成
各ハイブリドーマで発現するヒト抗体重鎖、及び軽鎖の抗体の可変領域を含むＤＮＡ断片を取得するために、ヒトＩｇγ、及びヒトＩｇκの各々の定常領域に特異的なプライマーを用いた５’ＲＡＣＥ（５’ｒａｐｉｄ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃＤＮＡ　ｅｎｄｓ）法によるクローニングを行なった。具体的には、ＢＤ　ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）を用い、添付の説明書にしたがって実施した。
ｃＤＮＡ合成の材料としては、ハイブリドーマ７－１０，４－４９，６－４－５０，６－５－２細胞にＲＮＡ抽出用試薬であるＩＳＯＧＥＮ（日本ジーン社製、日本）を添加し、取扱説明書にしたがってＴｏｔａｌ　ＲＮＡを精製した。精製したｔｏｔａｌ　ＲＮＡより各約１μｇを鋳型として用いて、ｌｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡを作製した。
ｌｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡの合成は、
Ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　１μｇ／３μｌ
５’ＣＤＳ　１μｌ
ＳＭＡＲＴ　Ｏｌｉｇｏ　１μｌ
上記組成の反応液を７０℃で２分間インキュベートした後、
５×Ｂｕｆｆｅｒ　２μｌ
ＤＴＴ　１μｌ
ＤＮＴＰ　ｍｉｘ　１μｌ
ＰｏｗｅｒＳｃｒｉｐｔ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　１μｌ
を加え４２℃で１．５時間インキュベートした。
さらに、５０μｌのＴｒｉｃｉｎｅ－ＥＤＴＡ　Ｂｕｆｆｅｒを加えた後、７２℃で７分間インキュベートし、１ｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡを取得した。
２）ＰＣＲによる重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅と塩基配列の確認
２－１）ＰＣＲによる重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅
ヒト抗体遺伝子のｃＤＮＡを増幅するために、ヒト抗体特異的配列を有する３’プライマー（具体的な配列は後記）とＢＤ　ＳＭＡＲＴ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔで合成されたｃＤＮＡの５’末端に付加された配列に特異的にハイブリダイズする５’プライマー（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ｐｒｉｍｅｒ　Ａ　ｍｉｘ）をＰＣＲ用のプライマーセットとして、またＰＣＲ用酵素としてＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡績（株）社製）を用いて、下記の反応液を調製してＰＣＲに供した。
ｓｔｅｒｉｌｅ　H_2O　２８μｌ
ｃＤＮＡ　２．５μｌ
ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｂｕｆｆｅｒ（１０Ｘ）　５μｌ
ｄＮＴＰ　Ｍｉｘ（２ｍＭ）　５μｌ
$MgSO_4$（２５ｍＭ）　２μｌ
ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（１ｕｎｉｔ／μｌ）１μｌ
Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ｐｒｉｍｅｒ　Ａ　ｍｉｘ（ＵＰＭ）（１０Ｘ）　５μｌ

Ｇｅｎｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｉｍｅｒｓ（ＧＳＰ）（１０μＭ） １．５μｌ
Ｔｏｔａｌ ｖｏｌｕｍｅ ５０μｌ

重鎖遺伝子の増幅反応には、ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ付属のＵＰＭプライマーとＩｇＧ１ｐプライマーを用い、他方、軽鎖遺伝子の増幅にはＵＰＭプライマーとｈｋ－２プライマーの各セットを使用した。

IgG1p プライマー：5’-TCTTGTCCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTG-3’（配列番号 18）

hk-2：5’-GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC -3’（配列番号 19）

また反応温度条件は次のとおりである。
９４℃／３０秒間、７２℃／３分間のサイクルを５回反復、
９４℃／３０秒間、７０℃／３０秒間、７２℃／３分間のサイクルを５回反復、
９４℃／３０秒間、６８℃／３０秒間、７２℃／３分間のサイクルを２５回反復した。

さらに、この反応液２μｌにＴｒｉｃｉｎｅ－ＥＤＴＡ Ｂｕｆｆｅｒ ９８μｌを加えて希釈したもの５μｌを鋳型とし、第一ＰＣＲよりも内側にプライマーを設定した第二ＰＣＲ（Ｎｅｓｔｅｄ ＰＣＲ）を実施した。ＰＣＲ反応溶液の組成を次に示す。

ｓｔｅｒｉｌｅ H_2O ３０μｌ
第一ＰＣＲ反応液（５０倍希釈） ５μｌ
ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｂｕｆｆｅｒ（１０Ｘ） ５μｌ
ｄＮＴＰ Ｍｉｘ（２ｍＭ） ５μｌ
$MgSO_4$（２５ｍＭ） ２μｌ
ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（１ｕｎｉｔ／μｌ） １μｌ
Ｎｅｓｔｅｄ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ｐｒｉｍｅｒ Ａ（ＮＵＰ；１０μＭ） １μｌ
Ｇｅｎｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｉｍｅｒｓ（ＧＳＰ）（１０μＭ） １μｌ
Ｔｏｔａｌ ｖｏｌｕｍｅ ５０μｌ

上記反応のプライマーセットとして、重鎖遺伝子増幅用の場合は、ＮＵＰＭプライマー（ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ付属；ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）とｈｈ２プライマー（４－４９、６－４－５０、６－５－２の場合）、或はＩｇＧ２ｐ＿１３４（７－１０の場合）を使用して、また、軽鎖遺伝子の増幅の場合は、ＵＰＭプライマーとｈｋ－５プライマーを用いた。反応温度条件としては、９４℃の初期温度で１分間の後、９４℃／５秒間、６８℃／１０秒及び７２℃／３分間のサイクルを２０回反復、最後に７２℃／７分間加熱した。

２－２）抗体遺伝子の塩基配列決定

上記の方法で増幅した重鎖ＰＣＲ断片（以下ＨＶ［Ｃ］と記載）は、重鎖の５’非翻訳領域、リーダー配列（分泌シグナル配列）、可変領域（ＨＶ）及び定常領域の一部（［Ｃ］）より構成される。同様に、軽鎖のＰＣＲ増幅断片（以下ＬＶ［Ｃ］と記載）は、軽鎖の５’非翻訳領域、リーダー配列（分泌シグナル配列）、可変領域（ＬＶ）及び定常領域の一部（［Ｃ］）より構成される。ここでリーダー配列（分泌シグナル）とは抗体の分泌に必要で、成熟抗体タンパク質からは切り離されるアミノ酸配列である。ＨＶ［Ｃ］断片およびＬＶ［Ｃ］断片は、ＰＣＲ反応液からエタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、メンブランを用いるＤＮＡ精製キットであるＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（キアゲン社製）にて精製した。精製したＨＶ［Ｃ］増幅断片あるいはＬＶ［Ｃ］増幅断片は、それぞれＺｅｒｏ Ｂｌｕｎｔ ＴＯＰＯ ＰＣＲ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（インビトロジェン社製）のｐＣＲ ４ Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。ＤＮＡ塩基配列決定のためにプライマーとして、Ｍ１３－２０ＦＷ及びＭ１３ＲＶを用いた。

hk-5：5’- AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC-3’（配列番号20）

hh2プライマー：5’- GCT GGA GGG CAC GG TCA CCA CGC TG -3’（配列番号21）

IgG2p_134：5’- TGCACGCCGC TGGTCAGGGC GCCTGAGTTC C -3’（配列番号22）

アゴニスト抗体７－１０の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

＜７－１０重鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG

GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT

GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG

AATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC

TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAATCTATGG

TTCGGGGAGTTCCGTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA（配列番号23）

＜７－１０重鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW

NSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFD LWGRGTLVTV SS

（配列番号24）

＜７－１０軽鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC

CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT

CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT

GCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC

ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTC

GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA（配列番号25）

＜７－１０軽鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW

NSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFDLWGRGTLVTVSS

（配列番号26）

アゴニスト抗体４－４９の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

＜４－４９重鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコード

するＤＮＡ配列まで）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGAGCAGCTGGTG

GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACCTTT

GATGATTATGCCATGTACTGGGTCCGGCAAGTTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG

AACAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCGTTTCCAGAGACAACGCCAAGAAC

TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGCCCTATGG

TTCGGGGAGTTCCCCCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA（配

列番号 27）

＜４－４９重鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）
（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLVAILKGVQCEEQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMYWVRQVPGKGLEWVSGISW

NSGSIGYADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALWFGEFPHYYGMDVWGQGTTVTVSS

（配列番号 28）

＜４－４９軽鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC

CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT

CAGGGCATTAGCAGTACTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT

GCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC

ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTT

GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT（配列番号 29）

＜４－４９軽鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）
（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSTLAWYQQKPGKAPKLLIYD

ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKR（配列番号 30）

アゴニスト抗体６－４－５０の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

＜６－４－５０重鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGAATTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG

GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACCTTT

GATAATTATGCCATGTACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG

AATAGTGGTGACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC

TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGGGATGCGGGG

TTCGGGGAGTTCCACTACGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA(配列番号31)

＜６－４－５０重鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）
（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDNYAMYWVRQAP

GKGLEWVSGISWNSGDIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDAG

FGEFHYGLDVWGQGTTVTVSS（配列番号32）

＜６－４－５０軽鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC

CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT

CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT

GCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC

ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTGGACGTTC

GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT（配列番号33）

＜６－４－５０軽鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）
（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKLLIYD

ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPWTFGQGTKVEIKR（配列番号34）

アゴニスト抗体６－５－２の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするＤＮＡ塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

＜６－５－２重鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTG

GAGTGTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT

GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG

AATAGTGGTAGTATAGGTTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC

TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAACCTATATGG

TTCGGGGAGTGGGGAAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA(配列番号35)

＜６－５－２重鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）
（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVECGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW

NSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPIWFGEWGNYYGMDVWGQGTTVTVSS

(配列番号36)

＜６－５－２軽鎖核酸配列＞（ＡＴＧ開始コドンより可変領域Ｃ末端アミノ酸残基をコードするＤＮＡ配列まで）

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTG

ACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT

GTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA

TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC

AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGC

CAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGT (配列番号37)

＜６－５－２軽鎖アミノ酸配列＞（リーダー配列及び可変領域まで）
（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA

SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIKR (配列番号38)

［実施例８］　組換え抗体発現ベクターの構築

上記の方法でハイブリドーマからクローニングした抗体の可変領域を、ヒト抗体発現用ベクターに組み込み、様々な定常領域を持った組換え抗体発現ベクターを作製した。

ヒト抗体発現用ベクター、Ｎ５ＫＧ１－Ｖａｌ　Ｌａｒｋ（以下Ｎ５ＫＧ１と略記）（ＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社製，ＵＳ　ｐａｔｅｎｔ　６００１３５８参照）は、組換え抗体を動物細胞に発現させる目的で使用されるプラスミドベクターである。Ｎ５ＫＧ１の構造を図４Ａに示した。Ｎ５ＫＧ１は、２つのＣＭＶプロモーター／エンハンサーを持ち、それぞれの下流に重鎖および軽鎖可変領域遺伝子のクローニングサイトを持つ。さらにその下流には、ヒト重鎖定常領域（γ１）およびヒト軽鎖定常領域（κ）をコードする遺伝子配列をあらかじめ持っている。本ベクターの可変領域クローニングサイトに任意の重鎖および軽鎖可変領域（リーダー配列＝分泌シグナル配列を含む）を、読み枠（フレーム）をあわせて組み込むことにより、軽鎖可変領域がヒトκ鎖定常領域と、重鎖可変領域がヒトγ１鎖定常領域と連結された抗体を発現させることができる。従っ

て、本ベクターを導入された動物細胞は培養液中にＩｇＧ１抗体を産生する。

同様に、発現ベクターＮ５ＫＧ４ＰＥ（ＩＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社製）は、ＩｇＧ４ＰＥの重鎖定常領域を持っている。ＩｇＧ４ＰＥとはＩｇＧ４に二つの変異（Ｓｅｒ２２８Ｐｒｏ，Ｌｅｕ２３５Ｇｌｕ）が入った配列である。Ｓｅｒ２２８ＰｒｏはＩｇＧ４の分子内架橋（Ｓ－Ｓ結合）による単量体形成を抑制する変異である。また、Ｌｅｕ２３５Ｇｌｕは抗体依存性細胞傷害（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ：ＡＤＣＣ）活性を低減させる変異である。

また、Ｎ５ＫＧ１のＩｇＧ１定常領域をＩｇＧ３に変換し、Ｎ５ＫＧ３を作製した。

さらに本実施例では、Ｎ５ＫＧ１，Ｎ５ＫＧ３，Ｎ５ＫＧ４ＰＥをもとに、重鎖定常領域（特にヒンジ領域）に種々の改変を加えた発現ベクターを作製した。

本実施例で定常領域に加えた改変は、第一に、抗体ドメイン間のサブクラスの入れ替えによるものである。抗体重鎖定常領域は、Ｎ末端側からＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３というドメイン構造を持っている。本実施例では、このドメイン単位で各サブクラスの配列を組み合わせた重鎖定常領域を作製した。例えば、ＣＨ１およびヒンジ領域はヒトＩｇＧ３の配列であり、ＣＨ２およびＣＨ３はヒトＩｇＧ１である重鎖定常領域を作製した。そして、このような重鎖定常領域を持つ抗体を、ＣＨ１／ヒンジ／ＣＨ２／ＣＨ３の順にサブクラスを表記し、ＩｇＧ３／３／１／１と名付けた（以降はＩｇＧ３３１１というように”／”を省略して表記する）。また、例えば、ヒンジ領域はヒトＩｇＧ３の配列であり、ＣＨ１，ＣＨ２およびＣＨ３はヒトＩｇＧ４ＰＥである重鎖定常領域を作製した。このような重鎖定常領域を持つ抗体をＩｇＧ４３４４と名付けた。

第二に、ヒトＩｇＧ３ヒンジ領域の改変体を作製した。抗体のヒンジ領域はアッパー（ｕｐｐｅｒ）ヒンジとミドル（ｍｉｄｄｌｅ）ヒンジに分けることができる。アッパーヒンジとはＫａｂａｔ ＥＵ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５th Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１））による表記で２１６以降、２２６よりＮ末端側の配列を指す。ミドルヒンジとは、同表記で２２６以降、２３１よりＮ末端側の配列を指す。ヒトＩｇＧ３のヒンジ領域は、アッパーヒンジが１２アミノ酸、ミドルヒンジが５０アミノ酸から成る。さらにミドルヒンジは、５アミノ酸と１５アミノ酸×３回のリピート配列に分けられる（５＋１５ｘ３＝５０）。本実施例では、ＩｇＧ３ミドルヒンジの繰り返し配列を１回に短縮した変異体を作製した。このようなヒンジをＧ３ｈ１と名付け、このタイプのヒンジを持つ抗体を、前述のドメイン単位の変異とあわせて、ＩｇＧｘ３ｘｘｈ１（ｘは任意）というように表記した。

また、ＩｇＧ３のミドルヒンジ後半の繰り返し配列を無くした重鎖定常領域も作製した。このようなヒンジをＧ３ｕｈ（ｕｐｐｅｒ ｈｉｎｇｅの略）と名付け、ＩｇＧｘ３ｘｘｕｈというように表記した。

さらにＧ３ｕｈヒンジにＬ２１７ＳとＲ２２８Ｐの変異を加えた重鎖定常領域を作製した。この変異にはＧ３ｕｈヒンジをよりＩｇＧ４ＰＥの配列に近づける意図がある。これをＧ３ｕｈｍ（ｕｐｐｅｒ ｈｉｎｇｅ ｍｕｔａｔｉｏｎの略）と名付け、これを持つ抗体をＩｇＧｘ３ｘｘｕｈｍと表記した。

図４Ｂに天然型のヒトイムノグロブリンと、ＩｇＧ４ＰＥ，ＩｇＧ４３４４，ＩｇＧ４３４４ｈ１，ＩｇＧ４３４４ｕｈ，ＩｇＧ４３４４ｕｈｍのヒンジ領域のアミノ酸配列を示す。

本実施例では抗Ｍｐｌアゴニスト抗体の可変領域を用いて、以下の定常領域を持つ抗体の発現ベクターを作製した。

ＩｇＧ１，ＩｇＧ４ＰＥ，ＩｇＧ３３１１，ＩｇＧ３３３１，ＩｇＧ３３４４，ＩｇＧ３３４４ｈ１，ＩｇＧ４３４４，ＩｇＧ４３４４ｈ１，ＩｇＧ４３４４ｕｈ，ＩｇＧ４３４４ｕｈｍ

以下に各発現ベクターの作製法を記載する。

１）ＩｇＧ１サブクラスの抗ｃ－Ｍｐｌ抗体発現ベクターの作製
１－１）抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体４－４９＿ＩｇＧ１及び７－１０＿ＩｇＧ１発現ベクターの作製

７－１０と４－４９については、Ｎ５ＫＧ１ベクターに最初に重鎖可変領域、次に、軽鎖可変領域の順に挿入して発現ベクターを作製した。

発現ベクター作製の工程を図４Ｃに示す。７－１０及び４－４９それぞれのＨＶ［Ｃ］およびＬＶ［Ｃ］断片（実施例７に記載）を含むプラスミドＤＮＡを鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（５’末側ＳａｌＩ、３’末側ＮｈｅＩ）を付加するようにデザインしたプライマーセットを用いて、重鎖および軽鎖のリーダー配列と可変領域のＤＮＡをＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ＤＮＡポリメラーゼによるＰＣＲで増幅した。このＰＣＲにより増幅された、重鎖および軽鎖のリーダー配列＋可変領域を、それぞれＨＶ断片、ＬＶ断片と表す。

まず、Ｎ５ＫＧ１に７－１０ＨＶ，４－４９ＨＶ断片の挿入を行った。ＨＶ断片増幅用のプライマーは、以下の通りである。

7-10；

HV断片5’用プライマー：40-3H5Sal

5’- AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAGTTGG GACTGAGCTG GATTT -3’（配列番号39）

HV断片3’用プライマー：40-3H3Nhe

5’- AGAGAGAGAG GCTAGCTGAG GAGACAGTGA CCAGGGTGCC A -3’（配列番号40）

4-49；

HV断片5’用プライマー：F24HSal

5’-AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT -3’（配列番号41）

HV断片3’用プライマー：C15H3Nhe

5’- AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3’（配列番号42）

反応温度条件としては、９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／５秒間と６８℃／４５秒間のサイクルを３５回反復し、最後に７２℃／７分間加熱した。増幅されたＤＮＡ断片を制限酵素ＳａｌＩとＮｈｅＩで消化して、アガロースゲル電気泳動で約４３０ｂｐのＤＮＡを回収し精製した。他方、Ｎ５ＫＧ１ベクターについては制限酵素ＳａｌＩ、ＮｈｅＩ処理を順次行った後、脱リン酸化のためにＡｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｃ７５）（宝酒造社製、日本）にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動とＤＮＡ精製キットで約８．９ｋｂのＤＮＡを回収した。これら２つの断片をＴ４　ＤＮＡ　ｌｉｇａｓｅを用いてライゲーションして、大腸菌ＤＨ１０Ｂへ導入して形質転換体を得た。得られた形質転換体のプラスミドＤＮＡについてＤＮＡ塩基配列を解析して、重鎖定常領域の５’上流に、ＨＶ断片がフレームを合わせて挿入されたプラスミドＤＮＡ、Ｎ５ＫＧ１＿７－１０＿Ｈｖ、及びＮ５ＫＧ１＿４－４９＿Ｈｖを取得した。

続いて、これらＨＶ断片が挿入されたプラスミドベクターにＬＶ断片（軽鎖リーダー配列＋可変領域）の挿入を行なった。ＬＶ［Ｃ］断片を含むプラスミドＤＮＡを鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（５’末側ＢｇｌＩＩ、３’末側ＢｓｉＷＩ）を付加するようにデザインしたプライマーを用いて、ＬＶ断片をＰＣＲで増幅した。ＬＶ増幅用プライマーは以下の通りである。

7-10；

LV断片5’用プライマー：165-1B_L18Bgl

5’- AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC-3’（配列番号43）

LV断片3’用プライマー：165_1B_L18_Bsi

5’- AGAGAGAGAG CGTACGTTTG ATCTCCACCT TGGTCCCTCC -3’（配列番号44）

4-49；

LV断片5’用プライマー：DNP_L1Bglp

5’- AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC -3’（配列番号45）

LV断片3’用プライマー：A27_R_N202

5’- AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGC-3’（配列番号46）

反応は９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／５秒間と６８℃／４５秒間のサイクルを３５回反復し、最後に７２℃／７分間の保温という条件で実施した。精製したＬＶの増幅ＤＮＡ断片は、ｐＣＲ４Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。ＤＮＡ塩基配列決定のためにプライマーとして、Ｍ１３－２０ＦＷとＭ１３ＲＶを用いた。挿入部分のＤＮＡ塩基配列解析を行い、鋳型としたＬＶと相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドＤＮＡ（ＴＯＰＯ＿７－１０＿Ｌｖ、及びＴＯＰＯ＿４－４９＿Ｌｖ）を選択した。次に、それぞれのＤＮＡを制限酵素ＢｇｌＩＩとＢｓｉＷＩで消化して、アガロースゲル電気泳動で約４００ｂｐのＤＮＡを回収し精製した。その精製ＤＮＡ断片と、制限酵素処理（ＢｇｌＩＩ，ＢｓｉＷＩ）及び、脱リン酸化処理を施した７－１０或は４－４９のＨＶが挿入されたベクター（約９．３ｋｂ）をＴ４　ＤＮＡ　ｌｉｇａｓｅによりライゲーションした後、大腸菌ＤＨ１０Ｂへ導入して形質転換体を得た。形質転換体について、ＤＮＡ配列解析や制限酵素切断パターンを解析し、目的のプラスミドＤＮＡを含むクローンを選択した。更に、得られた抗体発現プラスミドＤＮＡの大量精製を行い、重鎖全領域と軽鎖全領域、及び、その挿入部位周辺のＤＮＡ塩基配列にクローニング工程での変異がないことを確認した。７－１０＿ＩｇＧ１および４－４９＿ＩｇＧ１発現ベクターは、各々Ｎ５ＫＧ１＿７－１０、及びＮ５ＫＧ１＿４－４９と名付けた。

図４ＣにＮ５ＫＧ１＿７－１０、及びＮ５ＫＧ１＿４－４９の作製工程を図示した。

１－２）抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体６－４－５０＿ＩｇＧ１及び６－５－２＿ＩｇＧ１抗体発現ベクターの作製

６－４－５０、及び、６－５－２については、ヒト抗体発現用ベクターに最初に軽鎖可変領域、次に、重鎖可変領域の順に挿入して発現ベクターを作製した。

６－４－５０、及び、６－５－２抗体それぞれのＬＶ［Ｃ］断片を含むプラスミドＤＮＡ（実施例７）を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（５’末側　ＢｇｌＩＩ、３’末側ＢｓｉＷＩ）を付加するようにデザインしたプライマーセットを用いて、ＬＶ断片（軽鎖のリーダー配列＋可変領域）のＤＮＡをＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ＤＮＡポリメラーゼによるＰＣＲで増幅した。プライマーは以下の通りである。

6-4-50；

LV断片5’用プライマー：208LF

5’-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC -3’（配列番号47）

LV断片3’用プライマー：62LP3Bsi

5’- AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG -3’（配列番号48）

6-5-2；

LV断片5’用プライマー：A27_F

5’-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTC -3’（配列番号49）

LV断片3’用プライマー：202LR

5’- AGAGAGAGAGCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGC -3’（配列番号50）

反応温度条件としては、９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／５秒間と６８℃／４５秒間のサイクルを３５回反復し、最後に７２℃／７分間加熱した。増幅されたＤＮＡ断片を制限酵素ＢｇｌＩＩとＢｓｉＷＩで消化して、アガロースゲル電気泳動で約４００ｂｐのＤＮＡを回収し精製した。他方、Ｎ５ＫＧ１ベクターについては制限酵素ＢｇｌＩＩとＢｓｉＷＩ処理を順次行った後、脱リン酸化処理としてＡｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（Ｅ．ｃｏｌｉ Ｃ７５）（宝酒造社製）にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動とＤＮＡ精製キットで約８．９ｋｂのＤＮＡを回収した。これら２つの断片をＴ４ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅを用いてライゲーションして、大腸菌ＤＨ１０Ｂへ導入して形質転換体を得た。インサートＤＮＡを含む形質転換体のプラスミドＤＮＡについてＤＮＡ塩基配列を解析して、ＬＶ断片がＮ５ＫＧ１のヒト抗体軽鎖定常領域をコードする５’上流にフレームを合わせて挿入されたプラスミドＤＮＡ、Ｎ５ＫＧ１＿６－４－５０＿Ｌｖ、及びＮ５ＫＧ１＿６－５－２＿Ｌｖを取得した。引き続いて、このＬＶ断片が挿入されたプラスミドベクターにＨＶ断片（重鎖のリーダー配列＋可変領域）の挿入を行なった。ＨＶ［Ｃ］を含むプラスミドＤＮＡ（実施例７）を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（５’末側ＳａｌＩ、３’末側ＮｈｅＩ）を付加するようにデザインしたプライマーを用いて、ＨＶ断片をＰＣＲで増幅した。使用したプライマーは以下の通りである。

6-4-50；

HV断片5’用プライマー：50-5-7Hsal

5’- AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAATTGG GACTGAGCTG GATTTT -3’（配列番号51）

HV断片3’用プライマー：C15H3Nhe

5’ -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3’（配列番号52）

6-5-2；

HV断片5’用プライマー：F24HSal

5’- AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT-3’（配列番号53）

HV断片3’用プライマー：L66H3Nhe

5’- AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTC-3’（配列番号54）

反応は９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／５秒間と６８℃／４５秒間のサイクルを３５回反復し、最後に７２℃／７分間の保温という条件で実施した。精製したＨＶ断片の増幅ＤＮＡ断片は、一度ｐＣＲ４Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。ＤＮＡ塩基配列決定のためにプライマーとして、Ｍ１３－２０ＦＷとＭ１３ＲＶを用いた。挿入部分のＤＮＡ塩基配列解析を行い、鋳型としたＨＶと相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドＤＮＡ（ＴＯＰＯ＿６－４－５０＿Ｈｖ、及びＴＯＰＯ＿６－５－２＿Ｈｖ）を選択した。次に、それぞれのＤＮＡを制限酵素ＳａｌＩとＮｈｅＩで消化して、アガロースゲル電気泳動で約４３０ｂｐのＤＮＡを回収し精製した。並行して制限酵素処理（ＳａｌＩとＮｈｅＩ）、及び、脱リン酸化処理した６－４－５０或は６－５－２のＬＶ断片が挿入されたベクター（約９．３ｋｂ）に、インサートしたいＤＮＡ断片をライゲーションした後、大腸菌ＤＨ１０Ｂへ導入して、得られた形質転換体から目的のプラスミドＤＮＡを持つクローンを選択した。こうして得られた抗体発現プラスミドＤＮＡの大量精製を行い、重鎖全領域と軽鎖全領域、及び、その挿入部位周辺のＤＮＡ塩基配列にクローニング工程での変異がないことを確認した。６－４－５０＿ＩｇＧ１及び６－５－２＿ＩｇＧ１抗体発現ベクターを、それぞれＮ５ＫＧ１＿６－４－５０、及びＮ５ＫＧ１＿６－５－２と名付けた。

図４ＤにＮ５ＫＧ１＿６－４－５０、及びＮ５ＫＧ１＿６－５－２の作製工程を図示した。

２）ＩｇＧ４ＰＥサブクラスの抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体の作製

ＩｇＧ４ＰＥサブクラス抗体の発現ベクター作製には前述のＮ５ＫＧ４ＰＥベクターを用いた。Ｎ５ＫＧ４ＰＥのプラスミドＤＮＡを制限酵素ＮｈｅＩとＢａｍＨＩで切断して、重鎖定常領域を含む断片を精製して、抗ｃ－Ｍｐｌ抗体であるＮ５ＫＧ１＿７－１０、及びＮ５ＫＧ１＿４－４９の同じ制限酵素部位内につなぎ換えることにより、Ｎ５ＫＧ４ＰＥ＿７－１０、及びＮ５ＫＧ４ＰＥ＿４－４９を作製した。

３）Ｎ５ＫＧ３の作製

ヒトＩｇＧ３用発現ベクターＮ５ＫＧ３はＮ５ＫＧ１のＩｇＧ１重鎖定常領域を下記配列のＩｇＧ３定常領域に置換することで作製した。

ＩｇＧ３定常領域アミノ酸配列

STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA
KTKLREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEA
LHNRYTQKSLSLSPGK*（配列番号 55）

ＩｇＧ３定常領域塩基配列

CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGTTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
GAGTTGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGACACAACTCACACATGCCCACGGTGCCCAGAGCCCAAATCTTGTG
ACACACCTCCCCCGTGCCCACGGTGCCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCATGCCCACGGTGCC
CAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGT
CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGATACCCTTATGATTTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGG

TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAACACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCGCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA（配列番号 56）

４）ＩｇＧ３３１１発現ベクターの作製

ＩｇＧ３３１１発現ベクターは、Ｎ５ＫＧ３を鋳型として、プライマーｌｉｎｋＨ，１３ｃｈ１－Ｒで９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒の反応を１５回行った。同時に、Ｎ５ＫＧ１を鋳型として、プライマー１３ｃｈ１、ｌｉｎｋＨ２を用いて、９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒の反応を１５回行った。増幅したＤＮＡ断片をＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔで精製し、２つの精製ＤＮＡ断片を等量混合したのち、９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒の反応を５回行い、プライマーｌｉｎｋＨ、ｌｉｎｋＨ２を加えて、１５回反応した。増幅したＤＮＡ断片をＮｈｅＩ，ＢａｍＨＩで切断し、Ｎ５ＫＧ１ベクターのＩｇＧ１定常領域と置き換えた。この発現ベクターをＮ５ＫＧ３３１１と名づけた。

linkH: GGG TAC GTC CTC ACA TTC AGT GAT CAG (配列番号57)

13ch1-R: GTC TTC GTG GCT CAC GTC CAC CAC CAC GCA (配列番号58)

13ch1: TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC (配列番号59)

linkH2: TGA TCA TAC GTA GAT ATC ACG GC (配列番号60)

５）ＩｇＧ３３３１発現ベクターの作製

ＩｇＧ３３３１発現ベクターは、Ｎ５ＫＧ３を鋳型として、プライマーｌｉｎｋＨ，ＣＨ３ｃｏｎｓＲで９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒の反応を１５回行った。同時に、Ｎ５ＫＧ１を鋳型として、プライマーＣＨ３ｃｏｎｓ、ｌｉｎｋＨ２を用いて、９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒の反応を１５回行った。増幅したＤＮＡ断片をＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔで精製し、２つの精製ＤＮＡ断片を等量混合したのち、９８℃１秒、６０℃３０秒、７２℃３０秒の反応を５回行い、プライマーｌｉｎｋＨ、ｌｉｎｋＨ２を加えて、１５回反応した。増幅したＤＮＡ断片をＮｈｅＩ，ＢａｍＨＩで切断し、Ｎ５ＫＧ１ベクターのＩｇＧ１定常領域と置き換えた。この発現ベクターをＮ５ＫＧ３３３１と名づけた。

CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (配列番号61)

CH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (配列番号62)

以下に、ＩｇＧ３３４４，ＩｇＧ３３４４ｈ１，ＩｇＧ４３４４，ＩｇＧ４３４４ｈ１，ＩｇＧ４３４４ｕｈ，ＩｇＧ４３４４ｕｈｍの作製法を記す。これらについては、各定常領域をＰＣＲ法によって増幅し、それをクローニングしたプラスミドを作製した。ついで、それら改変定常領域をＮ５ＫＧ１＿７－１０等のＩｇＧ１定常領域と置換した。

６）ＩｇＧ３３４４，ＩｇＧ３３４４ｈ１定常領域の作製

ＩｇＧ３３４４発現ベクターは、Ｎ５ＫＧ３３３１およびＮ５ＫＧ４ＰＥを鋳型として、ＰＣＲを用いた変異導入（Ｏｖｅｒｌａｐ Ｅｘｔｅｎｔｉｏｎ法による部位特異的変異導入法）によって以下の手順で行った。

Ｎ５ＫＧ３３３１を鋳型として、プライマーとしてＧ３Ｇ４＿Ｐ１＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ２＿Ｒを用いて９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／１５秒間、５５℃／１０秒間、そして６８℃／１分間のサイクルを３５回反復し、最後に７２℃／７分間加熱した。同時に、前述発現ベクターＮ５ＫＧ４ＰＥを鋳型として、プライマーとしてＧ３Ｇ４＿Ｐ３＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを用いて同条件にてＰＣＲを実施した。増幅したＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（キアゲン社製）にて精製した。これらの精製ＤＮＡ断片を等量混合した後、最初の５サイクルについては、２ＤＮＡ断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／１０秒間、５５℃／１０秒間、そして６８℃／１．５分間という５サイクルの伸長反応を行なった後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてＧ３Ｇ４＿Ｐ１＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを加えて、更に９４℃／５秒間と６８℃／２分間のサイクルを２０回反復し、最後に７２℃／７分間の加熱を行なった。Ｇ３Ｇ４＿Ｐ１＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒのプライマーは、ヒト抗体定常領域のコード部分を切りだして、抗体の発現ベクターの該当する部分に変更可能とするために制限酵素部位（Ｇ３Ｇ４＿Ｐ１＿ＦにＮｈｅＩ、Ｇ３Ｇ４＿Ｐ４＿ＲにＢａｍＨＩ部位）が存在する。増幅したＰＣＲ断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した。精製した増幅断片は、Ｚｅｒｏ Ｂｌｕｎｔ ＴＯＰＯ ＰＣＲ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（インビトロジェン社製）のｐＣＲ４ Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりＩｇＧ３３４４およびＩｇＧ３３４４ｈ１定常領域を持つクローンを選択した。

G3G4_P1_F：5’-AGAGAGGCTA GCACCAAGGG CCCATCG-3’（配列番号63）

G3G4_P2_R：5’-GAACTCAGGT GCTGGGCACC TTGGGCACG-3’（配列番号64）

G3G4_P3_F：5’- CCAAGGTGCC CAGCACCTGA GTTCGAGGGG GGA -3’（配列番号65）

G3G4_P4_R：5’- AGAGAGGGAT CCTCATTTAC CCAGAGACAG GGA -3’（配列番号66）

７）ＩｇＧ４３４４定常領域の作製

ＩｇＧ４３４４発現ベクターの作製においては、Ｎ５ＫＧ３３３１を鋳型として、プライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿ＦとＧ４３４＿Ｐ６＿Ｒを用いて９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／１５秒間、５５℃／１０秒間、そして６８℃／１分間のサイクルを３５回反復し、最後に７２℃／７分間加熱した。同時に、Ｎ５ＫＧ４ＰＥを鋳型として、プライマーとしてＧ４３４＿Ｐ７＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ２＿Ｒを用いて同条件にてＰＣＲを実施した。増幅したＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（キアゲン社製）にて精製した。これらの精製２ＤＮＡ断片と、前述したＮ５ＫＧ４ＰＥを鋳型として、Ｇ３Ｇ４＿Ｐ３＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒをプライマーとして増幅・精製しておいたＤＮＡ断片の計３種類のＯｖｅｒｌａｐ Ｅｘｔｅｎｔｉｏｎ反応を実施した。すなわち、３種類のＤＮＡ断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて９４℃の初期温度で１分間の加熱後、９４℃／１０秒間、５５℃／１０秒間６８℃／１．５分間のサイクルを５回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを加えて、９４℃／５秒間と６８℃／２分間のサイクルを２０回反復し、最後に７２℃／７分間の加熱を行なった。増幅したＰＣＲ断片はＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した後、ｐＣＲ ４ Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりＩｇＧ４３４４定常領域を持つクローンを選択した。

G434_P5_F：5’- AGAGAGGCTA GCACCAAGGG GCCATCC -3’（配列番号67）

G434_P6_R：5’- GGTTTTGAGC TCAACTCTCT TGTCCACCTT GGTGTTGC -3’（配列番号68）

G434_P7_F：5’- GTGGACAAGA GAGTTGAGCT CAAAACCCCA CTTGGTGACA C -3’（配列番号69）

８）ＩｇＧ４３４４ｈ１定常領域の作製

ＩｇＧ４３４４ｈ１発現ベクターの作製は、Ｎ５ＫＧ４３４４を鋳型として、プライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿Ｆ，Ｇ４３４＿Ｐ６＿Ｒを用いて９８℃の初期温度で１０秒間の加熱後、９８℃／１０秒間、５５℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを７回反復し、次いで９８℃／１０秒間、６８℃／１分間のサイクルを３０回反復して、最後に７２℃／７分間加熱した。ＰＣＲ用酵素としては、Ｐｙｒｏｂｅｓｔ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ株式会社）を使用した。同時に、Ｎ５ＫＧ３３４４ｈ１を鋳型として、プライマーとしてＧ４３４＿Ｐ７＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを用いて同条件にてＰＣＲを実施した。増幅したＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（キアゲン社製）にて精製した。これらの精製ＤＮＡ断片を等量混合した後、２ＤＮＡ断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、９８℃の初期温度で１０秒間の加熱後、９８℃／１０秒間、５５℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを７回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを加えて、更に９８℃／１０秒間と６８℃／１分間のサイクルを３０回反復し、最後に７２℃／７分間の加熱

を行なった。増幅したＰＣＲ断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した。精製した増幅断片は、ｐＣＲ ４ Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりＧ４３４４ｈ１定常領域持つクローンを選択した。

９）ＩｇＧ４３４４ｕｈ定常領域の作製

Ｇ４３４４ｕｈの作製は、Ｎ５ＫＧ４３４４を鋳型として、プライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿Ｆと１７－１Ｒを用いて９８℃の初期温度で１０秒間の加熱後、９８℃／１０秒間、５０℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを５回反復し、次いで９８℃／１０秒間、５５℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを５回反復し、９８℃／１０秒間、６８℃／１分間のサイクルを２５回反復して、最後に７２℃／７分間加熱した。ＰＣＲ用酵素としては、Ｐｙｒｏｂｅｓｔ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ株式会社）を使用した。並行して、Ｎ５ＫＧ３３４４ｈ１を鋳型として、プライマーとして１７－２ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを用いて同条件にてＰＣＲを実施した。増幅したＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した。これらの精製ＤＮＡ断片を等量混合した後、２ＤＮＡ断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、９８℃の初期温度で１０秒間の加熱後、９８℃／１０秒間、６８℃／１分間のサイクルを５回、さらに９８℃／１０秒間、５５℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを５回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを加えて、更に９４℃／３０秒間と６８℃／１分間のサイクルを３０回反復し、最後に７２℃／７分間の加熱を行なった。増幅したＰＣＲ断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した。精製した増幅断片は、ｐＣＲ ４ Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりＩｇＧ４３４４ｕｈ定常領域を持つクローンを選択した。

17-1R：5’- AGGTGCTGGG CACCGTGGGC ATGTGTGAGT TGT -3’（配列番号70）

17-2F：5’- CACACATGCC CACGGTGCCC AGCACCTGAG TTC -3’（配列番号71）

１０）ＩｇＧ４３４４ｕｈｍ定常領域の作製

ＩｇＧ４３４４ｕｈｍ発現ベクターの作製は、Ｎ５ＫＧ４ＰＥを鋳型として、プライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿Ｆと１７ｍ－１Ｒを用いて９８℃の初期温度で１０秒間の加熱後、９８℃／１０秒間、５０℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを５回反復し、次いで９８℃／１０秒間、５５℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを５回反復し、９８℃／１０秒間、６８℃／１分間のサイクルを２５回反復して、最後に７２℃／７分間加熱した。ＰＣＲ用酵素としては、Ｐｙｒｏｂｅｓｔ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを使用した。並行して、Ｎ５ＫＧ４ＰＥを鋳型として、プライマーとして１７ｍ－２ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを用いて同条件にてＰＣＲを実施した。増幅したＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した。これらの精製ＤＮＡ断片を等量混合した後、２ＤＮＡ断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、９４℃／３０秒間、５５℃／３０秒間、そして７２℃／１分間のサイクルを７回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてＧ４３４＿Ｐ５＿ＦとＧ３Ｇ４＿Ｐ４＿Ｒを加えて、更に９４℃／３０秒間と６８℃／１分間のサイクルを３０回反復し、最後に７２℃／７分間の加熱を行なった。増幅したＰＣＲ断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔにて精製した。精製した増幅断片は、ｐＣＲ ４ Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドＤＮＡについてインサートＤＮＡの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりＩｇＧ４３４４ｕｈｍ定常領域を持つクローンを選択した。

17m-1R：5’－TGTGTGAGTT GTGTCACCAA GTGGGGTTTT GGACTCAACT CTCTTGTCCA CCTTGGT
-3’（配列番号72）

17m-2F：5’－ACCCCACTTG GTGACACAAC TCACACATGC CCACCATGCC CAGCACCTGA GTTCGAG
-3’（配列番号73）

図４Ｅに各種改変重鎖のアミノ酸配列を示した。

１１）各種改変重鎖定常領域を持った抗体発現ベクターの作製

作製した各種改変重鎖定常領域を持つプラスミドＤＮＡを、制限酵素ＮｈｅＩ，ＢａｍＨＩで切断後、定常領域配列を精製分離した。続いて、抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体発現ベクターＮ５ＫＧ１＿７－１０，Ｎ５ＫＧ１＿４－４９，Ｎ５ＫＧ１＿６－４－５０，Ｎ５ＫＧ１＿６－５－２を同酵素で処理し、定常領域を置換した。

図４Ｆに７－１０＿ＩｇＧ４３４４ｕｈｍの重鎖配列を示した。

図４Ｇに７－１０＿ＩｇＧ４３４４ｕｈｍの軽鎖配列を示した。

［実施例９］　抗ヒトｃ－Ｍｐｌ抗体の２９３Ｆ細胞での一過性発現、及び精製

実施例８で作製した発現ベクターＤＮＡをＥｎｄｏＦｒｅｅ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｋｉｔ（キアゲン社）にて調製し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅＴＭ　２９３　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（インビトロジェンライフテクノロジー社）を用いて浮遊性２９３細胞（インビトロジェンライフテクノロジー社）に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。孔径０．２２μｍのメンブランフィルター（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ製）で濾過した培養上清（ＩｇＧとして約５００μｇ）を抗体精製用アフニティーカラムであるＨｉＴｒａｐ　ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＦＦ（カラム体積１ｍｌ）（アマシャムバイオサイエンス社）にチャージし、ＰＢＳ（－）で洗浄後２０ｍＭクエン酸バッファー（ｐＨ３．４）により溶出し、２００ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．０）を含むチューブに回収した。

［実施例１０］　組換え型抗体の作製

構築した抗体発現ベクターを宿主細胞に導入して、抗体発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、ｄｈｆｒ欠損のＣＨＯ　ＤＧ４４細胞（ＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を無血清培地であるＥＸ－ＣＥＬＬ３２５ＰＦ（ＪＲＨ）に馴化した細胞株を用いた。宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションにより実施した。エレクトロポレーションは抗体発現ベクター約２μｇを制限酵素ＡｓｃＩで線状化し、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｔｅｒをもちいて３５０Ｖ、５００μＦの条件で、4×10^{6}個のＣＨＯ細胞に遺伝子を導入し、９６ｗｅｌｌ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ｐｌａｔｅに播種した。ベクターの導入処理後、Ｇ４１８を添加して培養を継続した。コロニーを確認した後、抗体発現株を選別した。選択したＣＨＯ細胞株をＥＸ－ＣＥＬＬ３２５－ＰＦ培地（ＪＲＨ）（２ｍＭ　ｇｌｕｔａｍｉｎｅ、１００ｕｎｉｔｓ／ｍｌ　ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ、１００μｇ／ｍｌ　ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ、ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ　ａｎｄ　ｔｈｙｍｉｄｉｎｅ（ＨＴ）サプリメント（１：１００）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む）で５％　CO_2条件下で培養した。培養上清をＭａｂｓｅｌｅｃｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）に吸着後、ＰＢＳで洗浄して、２０ｍＭクエン酸－Ｎａ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ３．４）バッファーで溶出した。溶出液は５０ｍＭ　Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－Ｎａ，ｐＨ７．０にて中和した。Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水にて、約１．５倍に希釈してＣｏｎｄｕｃｔｉｖｉｔｙを４．０ｍｓ／ｃｍ以下に調製した。次に、Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（Ｈｉｔｒａｐ　Ｑ　ＨＰ）（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）と、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＦＦ）（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｃｏ．，Ｌｔｄ．）を連結したカラムに、サンプルをチャージして吸着後、２０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ５．０）にて洗浄後、１×ＰＢＳバッファーにて溶出した。調製さ

れた抗体溶液は、孔径０．２２μｍのメンブランフィルターＭＩＬＬＥＸ－ＧＶ（ミリポア社製）でろ過滅菌した。精製した抗体の濃度は２８０ｎｍの吸光度を測定し、１ｍｇ／ｍＬを１．４ＯＤとして算出した。

組換え型の改変抗体を用いて、ＵＴ７／ＴＰＯアッセイ（実施例５）における活性を測定した。４－４９＿ＩｇＧ１に比べ、ＩｇＧ３３１１とＩｇＧ３３３１は活性の増強が見られた（図５Ａ）。７－１０＿ＩｇＧ４３４４ｕｈｍおよび４－４９＿ＩｇＧ４３４４ｕｈｍはＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦと同等の活性を示した。

表３に各種改変抗体の活性をまとめた。全てのアゴニスト抗体に関して、定常領域改変による活性の増強が見られた。７－１０，４－４９に関しては、ＩｇＧ１とＩｇＧ４ＰＥは同等の活性であったが、ＩｇＧ４３４４ｕｈｍはＩｇＧ４ＰＥに比べ高活性であった。ＩｇＧ４３４４ｕｈｍは、ＩｇＧ４ＰＥのアッパーヒンジ部７アミノ酸配列中のＣ末側４－７位がＩｇＧ３のアッパーヒンジ１２アミノ酸配列中の４－１２位の配列に置き換わっている（図４Ｂ参照）。従って、この部分が活性の増強に重要であると考えられる。

【表３】

表３

	2-35	7-10	4-49	6-4-50	6-5-2
IgG1	-	++	++	+	+
IgG4PE	NT	++	++	NT	NT
IgG3311	NT	+++	+++	++	++
IgG3331	NT	+++	+++	NT	NT
IgG3344	NT	+++	NT	NT	++
IgG3344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uh	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uhm	NT	+++	+++	NT	NT

+: EC_{50} 1-10nM
++: EC_{50} 0.1-1nM
+++: EC_{50} 0.01-0.1nM
NT: 試験せず

［実施例１１］　アゴニスト抗体によるシグナル伝達

ＴＰＯが受容体であるｃ－Ｍｐｌに結合すると、細胞内タンパク質のリン酸化が起こる。ＴＰＯによって活性化する主要な経路は、Ｊａｋ－ＳＴＡＴ，Ｒａｓ－ＭＡＰＫ，ＰＩ３Ｋ－Ａｋｔの３つが知られている。アゴニスト抗体によるｃ－Ｍｐｌ下流のリン酸化シグナル伝達の解析を行った。解析は、リン酸化タンパク質特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法で行った。以下に使用した抗体を列記する。抗ＳＴＡＴ５（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社製，Ｃａｔ＃９３５２），抗ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＴＡＴ５（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社製，Ｃａｔ＃９３５１Ｌ），抗ＪＡＫ２（Ｕｐｓｔａｔｅ社製，Ｃａｔ＃０６－２５５），抗ｐｈｏｓｐｈｏ－ＪＡＫ２（Ｕｐｓｔａｔｅ社製，Ｃａｔ＃０７－６０６），抗Ｅｒｋ１／２（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社製，Ｃａｔ＃９２７２），抗ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｅｒｋ１／２（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社製，Ｃａｔ＃９２７１Ｌ），抗Ａｋｔ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社製，Ｃａｔ＃９１０２），抗ｐｈｏｓｐｈｏ－Ａｋｔ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ社製，Ｃａｔ＃９１０１Ｓ）。

これら抗体を使用し、以下の手順でアッセイを行った。

１）ＵＴ７／ＴＰＯ細胞をサイトカイン非添加ＩＭＤＭ培地で洗浄し、６時間培養した。

２）培養後、細胞を１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調製し、６－ｗｅｌｌプレートに２ｍＬ／ｗｅｌｌで播いた。

３）ウェルに、アゴニスト抗体または陽性コントロールとしてＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦを添加し、細胞を刺激した。

４）最短５分～最長２時間の刺激時間の後に細胞を回収し、氷冷ＰＢＳにて細胞を洗浄した。

５）遠心分離で細胞をペレットにし、上清を除去後、ＰｈｏｓｐｈｏＳａｆｅ^{TM} Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製，Ｃａｔ＃７１２９６）でペレットを溶解したのち、再度遠心して、上清（細胞抽出液）を回収した。

６）上記５．の細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロット法でリン酸化タンパク質を検出した。

結果を図６に示す。アゴニスト抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍおよび４－４９Ｇ４３４４ｕｈｍによって、ＴＰＯシグナルと同様の経路のリン酸化が見られた（図６Ａ）。抗体６－５－２については、ＩｇＧ１はＪａｋ２，ＳＴＡＴ５のリン酸化が観察されなかったが、ＩｇＧ３３４４はＪａｋ２，ＳＴＡＴ５のリン酸化が見られた（図６Ｂ）。

［実施例１２］　ヒト血小板に対するプライミング作用検討

ＴＰＯはそれ自体では血小板凝集を起こさないが、ＡＤＰ等の凝集惹起物質による血小板凝集を促進する作用（プライミング作用）がある。アゴニスト抗体によるヒト血小板プライミング作用を以下の手順で調べた。

１）抗凝固剤として、３．１％（ｗ／ｖ）クエン酸三ナトリウムを１０分の１容量加えた、健常人の末梢血を遠心分離（１４０ｇ，１５ｍｉｎ）し、多血小板血漿（Ｐｌａｔｅｌｅｔ Ｒｉｃｈ Ｐｌａｓｍａ、以下ＰＲＰ）を調製した。

２）さらに遠心分離（２５００ｇ，１５ｍｉｎ）して血球成分を沈殿させ、血漿を採取した。

３）ＰＲＰに含まれる血小板数を測定し、血漿を用いて血小板数を３ｘ１０^{5}／μＬにあわせた。

４）上記３．で調製した血小板浮遊液１００μＬに検体を加え、攪拌しながら３分間インキュベーションした。

５）３０μＭ ＡＤＰ（ＳＩＧＭＡ社製）を５μＬ添加し、血小板凝集による濁度の低下を測定した。測定にはＭＣメディカル社製，Ｈｅｍａｔｒａｃｅｒ８０１を用いた。

結果を図７に示す。ＡＤＰ添加条件下で、アゴニスト抗体によるプライミング作用が観察された。抗体単独（ＡＤＰなし）では、血小板凝集は起こらなかった。

［実施例１３］　カニクイザル投与

アゴニスト抗体をカニクイザルに投与し、血小板数の変動を解析した。使用個体のＴＰＯに対する反応性を確かめるため、初日（Ｄａｙ０）にＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ（１０μｇ／ｋｇ）を静脈内投与し３週間経過を観察した後、初回投与後２１日目に精製アゴニスト抗体７－１０Ｇ４ＰＥ（個体Ａ）７－１０Ｇ３３４４ｈ１（個体Ｂ）を用量１ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。

結果を図８に示す。Ａ，Ｂ両方の個体でＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦによる一過性の血小板上昇が見られた。個体Ｂではアゴニスト抗体７－１０Ｇ３３４４ｈ１投与後に、血小板数の上昇が見られた。また、抗体投与による重篤な毒性は見られなかった。

［実施例１４］　ヒト臍帯血移植モデルにおける作用検討

実施例１０で作製したアゴニスト抗体が、ヒト臍帯血移植モデルにおけるヒト造血系の構築を促進することを確認するため、以下の手順で実験を行った。

・　ＮＯＧ（ＮＯＤ／ＳＣＩＤ／ＩＬ２－γＲ　ＫＯ）マウス（実験動物中央研究所（日本国神奈川県川崎市）より購入）に移植前処置として放射線照射（２グレイ）を行い、ヒト臍帯血由来ＣＤ３４＋細胞を１，０００ないし１０，０００個、尾静脈より注入移植した。

・　移植後一日目に最初の被検物質投与を行い、その後、週に一回投与を実施した。群構成と各々の被検物質および投与量は下記のとおりである。匹数は各群６匹、投与は腹腔

内投与で行った。また、毎週の投与時に体重測定を行った。

＜群構成，被検物質，投与量＞

Ｉ：移植数１０，０００，ＰＢＳ（コントロール）投与

ＩＩ：移植数１，０００，ＰＢＳ投与

ＩＩＩ：移植数１０，０００，抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ投与，１００μｇ／ｈｅａｄ／ｗｅｅｋ

ＩＶ：移植数１，０００，抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ投与，１００μｇ／ｈｅａｄ／ｗｅｅｋ

Ｖ：移植数１０，０００，ＴＰＯ（ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ）投与，５μｇ／ｈｅａｄ／ｗｅｅｋ

ＶＩ：移植数１，０００，ＴＰＯ（ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ）投与，５μｇ／ｈｅａｄ／ｗｅｅｋ

・　移植前１日と移植後２、４、６週に末梢血の解析を行った。末梢血解析の手順は下記のとおりである。

＜末梢血解析手順＞

・　キャピラリーを用いて、マウス眼窩静脈より末梢血（約７０μＬ）を採取した。

・　ＫＸ－２１自動血球解析システム（Ｓｙｓｍｅｘ社製）を用いて血球数を測定した。

・　ヒト血小板および白血球のキメラ率を調べるため、以下のＡおよびＢに挙げた各抗体の組み合わせで染色し、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒで解析した。Ａ（血小板解析用）：ＰＥ標識－抗ヒトＣＤ４１抗体（Ｄａｋｏ社製Ｒ７０５８）＋ＦＩＴＣ標識－抗マウスＣＤ４１抗体（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ社製＃５５３８４８）、Ｂ（白血球解析用）：ＡＰＣ標識－抗ヒトＣＤ４５抗体（ベックマン・コールター社製ＩＭ２４７３）＋ＦＩＴＣ標識－抗マウスＣＤ４５抗体（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ社製＃５５３０８０）。また、解析の際に定量用の蛍光ビーズ（フローカウントビーズ）を加え、一定量の血液を解析できるようにした。

・　血小板・白血球ともに、ヒト細胞数／（ヒト細胞数＋マウス細胞数）×１００（％）、という式でキメラ率を算出した。末梢血中の全血小板数とキメラ率を乗じることにより、ヒト血小板数を算出した。

・　６週目にマウスを屠殺し、大腿骨から骨髄細胞を採取した。それを用いてコロニーアッセイを行い、ヒトの巨核球系（ＭＫ）および赤血球系（Ｅ）、顆粒球・マクロファージ系（ＧＭ）の前駆細胞の数を測定した。巨核球系前駆細胞（ＣＦＵ－Ｍｋ）を検出するコロニーアッセイは、培養中にＴＰＯ（５０ｎｇ／ｍＬ）とＳＣＦ（１００ｎｇ／ｍＬ）を加えて行った。３７℃、５％CO_2条件下で１２日間の培養を行った。コロニーの検出は実施例６と同様に抗ヒトＣＤ４１抗体を用いて行った。赤血球系、顆粒球・マクロファージ系の前駆細胞を検出するコロニーアッセイは、Ｍｅｔｈｏｃｕｌｔ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて、培養中にＥＰＯ（４１Ｕ／ｍＬ），ＳＣＦ（１００ｎｇ／ｍＬ），ＩＬ－３（２０ｎｇ／ｍＬ），ＧＭ－ＣＳＦ（１０ｎｇ／ｍＬ）を加えて行った。３７℃，５％CO_2，５％O_2条件下で１４日間の培養を行った。培養後、顕微鏡下でコロニーのカウントを行った。

図９Ａ、９Ｂ及び９Ｃに本実験の結果を図示した。

移植後６週の時点において、抗体投与群では、他群に比べ、末梢血ヒト血小板数が有意に高かった（図９Ａ）。これにより、アゴニスト抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍは臍帯血移植時の血小板回復を促進することが示唆された。さらに抗体投与群では、骨髄中のヒト赤血球系および顆粒球・マクロファージ系前駆細胞の数が有意に高かった（図９Ｂ）。またマウス白血球に対するヒト白血球の割を示すＣＤ４５キメラ率においても有意に高かったことから、抗体投与群においてヒト白血球が増加していることがわかる（図９Ｃ）。このことは７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍが巨核球系のみならず、他系列の細胞の生着も促進できる可能性を示唆している。

これらの知見から、アゴニスト抗体は、血球が巨核球系・赤血球系・顆粒球・マクロフ

ァージ系に分かれるより上流の細胞に作用していることが示唆された。Ｍｐｌが造血幹細胞に発現しているという知見とあわせて考えると、アゴニスト抗体は造血幹細胞の増殖を促進している可能性が高い。

ちなみに本実験ではＴＰＯ投与群では同様の効果が見られなかった。これに対しては、ＴＰＯがマウス造血細胞にも作用するため、ＴＰＯ投与群では骨髄中でヒト細胞とマウス細胞の競合が起こり、純粋にヒト細胞に対する作用を観察できていない可能性を考慮しなければならない。本アゴニスト抗体は、ヒトＭｐｌにしか作用しないことを特徴とすることから、Ｍｐｌを介したシグナルがヒト臍帯血造血幹細胞の増幅に効果があることを、ｉｎ ｖｉｖｏで初めて明らかにすることができた。

［実施例１５］ ヒンジ改変抗体の抗原性解析

本発明のアゴニスト抗体はヒンジ部分の改変によって活性を増強していることを特徴としているが、改変による抗原性の上昇が懸念された。そこで、ヒンジ改変体である７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍのアミノ酸配列をもとに、コンピュータ上での抗原性予測を実施した。

体内に投与された外来タンパク質は樹状細胞、マクロファージ等の抗原提示細胞（ＡＰＣ）に取り込まれ、分解された後、ペプチドが主要組織適合抗原複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩ分子（ヒトの場合ＨＬＡ ｃｌａｓｓ ＩＩ，ＨＬＡ－ＤＲ，ＤＱ，ＤＰ）によって抗原提示される。ＡＰＣによって提示されたペプチドはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）によって認識され、Ｔ細胞を活性化させる。活性化されたＴ細胞（ヘルパーＴ細胞）は同抗原を認識する抗体を発現するＢ細胞を活性化し、外来タンパク質に対する抗体が産生される。この機構の中で、ペプチドとＭＨＣクラスＩＩ分子との親和性が抗原性を規定する大きな要因となっている。ヒトのＭＨＣクラスＩＩ分子には多くの型（多型）があり、同じペプチドであってもクラスＩＩ分子の型によって親和性は大きく異なることが知られている。

そこで、７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍとＩｇＧ４ＰＥの定常領域を持つ別のヒト抗体のアミノ酸配列を、様々な型のヒトＨＬＡ－ＤＲ，ＤＱ，ＤＰ分子との親和性を解析した（ＨＬＡ分子のデータベースおよび、解析のアルゴリズムはＡｌｇｏＮｏｍｉｃｓ社より提供された）。

その結果、ヒンジ改変による新たなエピトープ出現はなかった。本改変抗体を医薬品として利用する際に抗原性の問題はないことが示唆された。

［実施例１６］ ヒトＭｐｌトランスジェニックマウスへの抗体投与

本発明の抗体はマウスＭｐｌには交叉しないため、薬効を測定するため、外来遺伝子としてヒトＭｐｌを導入したトランスジェニック（Ｔｇ）マウスを作製し、抗体を投与する実験を行った。まず、マウスＭｐｌのプロモータ領域５．５ｋｂをＰＣＲで増幅し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔプラスミドベクターにクローニングした。次に、ヒトＭｐｌの翻訳領域および３’側非翻訳領域をＰＣＲで増幅し、マウスＭｐｌプロモーター下流に連結した。このコンストラクトをＣ５７ＢＬ／６マウス受精卵に注入し、受精卵を仮親に戻し出産させた。生後３週経過した時点で尻尾からゲノムＤＮＡを抽出し、ＰＣＲでＴｇマウスを選別した。得られたＴｇマウス個体をＣ５７ＢＬ／６と交配し、系統化した。骨髄でのヒトＭｐｌの発現解析を行った。

その結果、複数のヒトＭｐｌを持つＴｇマウス系統が得られた。そのうち、３９Ｌ系統の骨髄ではヒトＭｐｌが発現していることがＲＴ－ＰＣＲで確認された。３９Ｌ系統のマウスを用いて抗体の薬効を確認した。

アゴニスト抗体７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍを単回投与（３又は１０μｇ／ｍＬ）し、末梢血中の血小板数の推移を、ＫＸ－２１自動血球解析装置を用いて調べた。末梢血の採取は眼窩静脈より行い、毎週測定を行った。陽性コントロールとしてＴＰＯ（ＰＥＧ－ｒＨｕＭＧＤＦ）を用いた。群構成は以下のとおりである（各群６匹）。

Ｉ：７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ １０μｇ投与群
ＩＩ：７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ ３μｇ投与群
ＩＩＩ：ＴＰＯ ３μｇ投与群
ＩＶ：ＰＢＳ投与群

ＶＩ：野生型マウス７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ　１０μｇ投与群

結果を図１０に示す。抗体投与群、ＴＰＯ投与群で血小板が増加した。ＴＰＯ投与群は投与後２週間でほぼベースラインに戻った。これに対して抗体投与群は投与後一ヶ月を経過しても血小板数は上昇したままであった。この結果から、アゴニスト抗体は血中で非常に安定であり、単回投与で長期にわたって血小板造血を促進できることが示唆された。このことから、特にアゴニスト抗体は慢性血小板減少症の治療に適していることが示唆された。

［実施例１７］　７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ軽鎖変異体の活性評価

アゴニスト抗体７－１０の軽鎖可変領域（７－１０ＶＬ）のフレームワーク領域に変異を導入し、結合活性及びアゴニスト活性に与える影響を調べた。軽鎖の変異体はアゴニスト抗体４－４９の軽鎖（Ｖ１０４Ｌ）、アゴニスト６－４－５０の軽鎖のアミノ酸を１つ置換したもの（Ａ４３Ｖ，Ｇ１００Ｑ）の３種である。これら変異軽鎖と７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ重鎖を組み合わせた抗体を作製したところ、全て、結合活性、アゴニスト活性ともにオリジナルの７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍと同等であった。一方で、アゴニスト抗体７－１０の軽鎖可変領域の相補性決定領域（ＣＤＲ領域）に変異（Ｙ９４Ｆ）を導入した場合、結合活性、アゴニスト活性ともに１０分の１程度に低下した。この結果から軽鎖アミノ酸配列には、ある程度の自由度があることが示された。

各変異体の軽鎖アミノ酸配列及び７－１０ＶＬのアミノ酸配列は、以下のとおりである。なお、変異部は太字と下線で示した。

7-10VL（配列番号３）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT

LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

7-10VL_V104L（4-49VL;配列番号 85）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT

LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTK**L**EIK

7-10VL_G100Q（6-4-50VL 置換体 1;配列番号 86）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT

LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFG**Q**GTKVEIK

7-10VL_A43V（6-4-50VL 置換体 2;配列番号 87）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGK**V**PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF

TLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

7-10VL_Y94F（CDR 置換体;配列番号 88）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT

LTISSLQPEDFATYYCQQFNS**F**PLTFGGGTKVEIK

結合活性解析：各抗体の濃度を１，０．１，０．０１μｇ／ｍＬに調製し、ＦＭ３Ａ－ｈＭｐｌ細胞を用いたフローサイトメトリーを行った。実験方法は実施例４に記載の方法で行った。コントロールに抗ＤＮＰ（ジニトロフェノール）抗体（サブクラスＩｇＧ４；ヒト抗体）を用いた。軽鎖変異抗体は７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍと同等の結合活性を示した（図１１）。

アゴニスト活性解析：実施例５に記載の方法で、ＵＴ－７／ＴＰＯ細胞を用いた細胞増

殖アッセイを行った。軽鎖変異抗体は７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍと同等のアゴニスト活性を示した（図１２）。

【産業上の利用可能性】

【０００７】

本発明により、種々の血小板減少症に対する治療薬として利用できる、抗ヒトｃＭｐｌアゴニストヒト抗体が提供された。また他のアゴニスト抗体にも応用し得る、高い安全性と薬効を期待し得る、抗体の定常領域が提供された。

本発明により、全長抗体でヒトトロンボポエチン受容体（ｃ－Ｍｐｌ）を活性化しうるヒトｃ－Ｍｐｌに対するアゴニスト抗体が提供される。このアゴニスト抗体は、種々の血小板減少症に対する治療薬として使用可能であり、医療産業上多大な寄与が期待される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

【０００８】

配列番号１１：変異ヒンジドメインＵＨ２Ｇ３ｕｈｍ
配列番号１２～１６：プライマー
配列番号１８～２２：プライマー
配列番号３９～５４：プライマー
配列番号５７～７３：プライマー
配列番号７４：Ｇ３３４４ｈ１
配列番号７５：Ｇ３３４４
配列番号７６：Ｇ４３４４
配列番号７７：Ｇ４３４４ｈ１
配列番号７８：Ｇ４３４４ｕｈ
配列番号７９：Ｇ４３４４ｕｈｍ
配列番号８０：Ｇ４ＰＥ
配列番号８１：７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ　Ｈ鎖
配列番号８２：７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ　Ｈ鎖
配列番号８３：７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ　Ｌ鎖
配列番号８４：７－１０Ｇ４３４４ｕｈｍ　Ｌ鎖
配列番号８５：７－１０ＶＬ＿Ｖ１０４Ｌ（変異体）
配列番号８６：７－１０ＶＬ＿Ｇ１００Ｑ（変異体）
配列番号８７：７－１０ＶＬ＿Ａ４３Ｖ（変異体）

［配列表］

SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> Agonistic antibodies to human thrombopoietin receptor

<130> PH-3098-PCT

<150> JP 2006-81322
<151> 2006-03-23

<150> JP 2006-299554
<151> 2006-11-02

<160> 94

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
1 5 10 15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
20 25 30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
35 40 45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
65 70 75 80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
85 90 95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
100 105 110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
115 120 125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
130 135 140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
145 150 155 160

Val Pro Ser

<210> 2
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Leu Trp Phe Gly Glu Phe Pro His Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Thr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Gly Phe Gly Glu Phe His Tyr Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 108
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Cys Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Ile Trp Phe Gly Glu Trp Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutated hinge Domain UH1G3uh

<400> 10
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutated hinge Domain UH2G3uhm

<400> 11
Glu Ser Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
agagagagag gaattcgcca ccatgccctc ctgggccctc tt 42

<210> 13
<211> 43

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
agagagagag cggccgctca aggctgctgc caatagctta gtg 43

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
gtaaaacgac ggccagtg 18

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15
caggaaacag ctatgac 17

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 16
ctgctgctgc tgaggtcgca gtttcctgca cactac 36

<210> 17
<211> 491
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala
20 25 30

Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu
35 40 45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln
50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro
85 90 95

Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys
100 105 110

Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp
115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly
130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro
165 170 175

Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr
180 185 190

Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln
195 200 205

Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln
210 215 220

Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser
225 230 235 240

Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu
245 250 255

Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp
260 265 270

Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly
275 280 285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln
290 295 300

Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala
305 310 315 320

Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu
325 330 335

Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys
340 345 350

His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val
355 360 365

Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp
370 375 380

Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu
385 390 395 400

Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp
405 410 415

Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His
420 425 430

Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr
435 440 445

Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg
450 455 460

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro
465 470 475 480

Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp
485 490

<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18
tcttgtccac cttggtgttg ctgggcttgt g 31

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19
gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 20
aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc 30

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 21
gctggagggc acggtcacca cgctg 25

<210> 22
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 22
tgcacgccgc tggtcagggc gcctgagttc c 31

<210> 23
<211> 426
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctattt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaata gtggtagcat aggctatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa aaatctatgg 360
ttcggggagt tccgttactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 420
tcctca 426

<210> 24
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 25
<211> 387
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

<210> 26
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 27
<211> 429
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
atggagttgg gactgagctg gattttcctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gagcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120
tgtacagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgt actgggtccg gcaagttcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaaca gtggtagcat aggctatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccgtttcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttatatt actgtgcaaa agccctatgg 360
ttcggggagt tcccccacta ctacggtatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 420
gtctcctca 429

<210> 28
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Leu Trp Phe Gly Glu Phe Pro His Tyr Tyr
115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 29
<211> 390
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagta ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gtacactttt 360
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacgt 390

<210> 30
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Thr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg
130

<210> 31
<211> 423
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
atggaattgg gactgagctg gattttcctt ttggctattt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120
tgtgcaacct ctggattcac ctttgataat tatgccatgt actgggtccg gcaagctcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaata gtggtgacat aggctatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaag ggatgcgggg 360
ttcggggagt tccactacgg tctggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
tca 423

<210> 32
<211> 141
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

```
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
  1               5                  10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
             20                  25                  30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
         35                  40                  45

Asp Asn Tyr Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
     50                  55                  60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala
 65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                 85                  90                  95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gly Phe Gly Glu Phe His Tyr Gly Leu
        115                 120                 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 33
<211> 390
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33

```
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
```

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagttcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gtggacgttc 360
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgt 390

<210> 34
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg
130

<210> 35

<211> 429
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctattt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gtgcaactgg tggagtgtgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaata gtggtagtat aggttatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa acctatatgg 360
ttcggggagt ggggaaacta ctacggtatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 420
gtctcctca 429

<210> 36
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Cys Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Ile Trp Phe Gly Glu Trp Gly Asn Tyr Tyr
115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 37
<211> 387
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc 360
caagggacac gactggagat taaacgt 387

<210> 38
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg

<210> 39
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 39
agagagagag gtcgaccacc atggagttgg gactgagctg gattt 45

<210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 40
agagagagag gctagctgag gagacagtga ccagggtgcc 40

<210> 41
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 41
agagagagag gtcgaccacc atggagttgg gactgagctg gattt 45

<210> 42
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 42
agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt 37

<210> 43
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 43
agagagagag atctctcacc atggacatga gggtccccgc tc 42

<210> 44
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 44
agagagagag cgtacgtttg atctccacct tggtccctcc 40

<210> 45
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 45
agagagagag atctctcacc atgagggtcc ccgctcagct c 41

<210> 46
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 46
agagagagag cgtacgtttg atttccacct tggtcccttg gc 42

<210> 47
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 47
agagagagag atctctcacc atggacatga gggtccccgc tcagc 45

<210> 48
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 48
agagagagag cgtacgtttg atttccacct tggtcccttg 40

<210> 49
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 49
agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tctcttc 47

<210> 50
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 50
agagagagag cgtacgttta atctccagtc gtgtcccttg gc 42

<210> 51
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 51
agagagagag gtcgaccacc atggaattgg gactgagctg gatttt 46

<210> 52
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 52
agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt 37

<210> 53
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 53
agagagagag gtcgaccacc atggagttgg gactgagctg gattt 45

<210> 54
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 54
agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggtc 38

<210> 55
<211> 376
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

```
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
  1               5                  10                  15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
             20                  25                  30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
         35                  40                  45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
     50                  55                  60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65                  70                  75                  80

Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
                 85                  90                  95

Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg
            100                 105                 110

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
        115                 120                 125

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
    130                 135                 140

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
145                 150                 155                 160

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                165                 170                 175

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            180                 185                 190

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val
        195                 200                 205

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu Gln
```

210 215 220

Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
225 230 235 240

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
245 250 255

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
260 265 270

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
275 280 285

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
290 295 300

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
325 330 335

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
340 345 350

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys
355 360 365

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 56
<211> 1133
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
ctagcaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctctgggg 60
gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag 180

gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagtttgggc acccagacct 240
acacctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagctca 300
aaaccccact tggtgacaca actcacacat gcccacggtg cccagagccc aaatcttgtg 360
acacacctcc cccgtgccca cggtgcccag agcccaaatc ttgtgacaca cctcccccat 420
gcccacggtg cccagagccc aaatcttgtg acacacctcc cccgtgccca aggtgcccag 480
cacctgaact cctgggagga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggataccc 540
ttatgatttc ccggaccccc gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc 600
ccgaggtcca gttcaagtgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc 660
tgcgggagga gcagtacaac agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc 720
aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc 780
ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gacagccccg agaaccacag gtgtacaccc 840
tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag 900
gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact 960
acaacaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca 1020
ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg atgcatgagg 1080
ctctgcacaa ccgctacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1133

<210> 57
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 57
gggtacgtcc tcacattcag tgatcag 27

<210> 58
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 58
gtcttcgtgg ctcacgtcca ccaccacgca 30

<210> 59
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 59
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 30

<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 60
tgatcatacg tagatatcac ggc 23

<210> 61
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 61
ggtgtacacc tgtggctctc ggggctgccc 30

<210> 62
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 62
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 30

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 63
agagaggcta gcaccaaggg cccatcg 27

<210> 64
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 64
gaactcaggt gctgggcacc ttgggcacg 29

<210> 65
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 65
ccaaggtgcc cagcacctga gttcgagggg gga 33

<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 66
agagagggat cctcatttac ccagagacag gga 33

<210> 67
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 67
agagaggcta gcaccaaggg gccatcc 27

<210> 68
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 68
ggttttgagc tcaactctct tgtccacctt ggtgttgc 38

<210> 69
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 69
gtggacaaga gagttgagct caaaacccca cttggtgaca 40

<210> 70
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 70
aggtgctggg caccgtgggc atgtgtgagt tgt 33

<210> 71
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 71
cacacatgcc cacggtgccc agcacctgag ttc 33

<210> 72
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 72
tgtgtgagtt gtgtcaccaa gtggggtttt ggactcaact ctcttgtcca ccttggt 57

<210> 73
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 73
accccacttg gtgacacaac tcacacatgc ccaccatgcc cagcacctga gttcgag 57

<210> 74
<211> 347
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G3344h1

<400> 74
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
145 150 155 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
165 170 175

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
180 185 190

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
195 200 205

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
210 215 220

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
225 230 235 240

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
245 250 255

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
260 265 270

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
275 280 285

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
290 295 300

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
305 310 315 320

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
325 330 335

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
340 345

<210> 75
<211> 377
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G3344

<400> 75
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

```
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            180                 185                 190

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
        195                 200                 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    210                 215                 220

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225                 230                 235                 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                245                 250                 255

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            260                 265                 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
        275                 280                 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    290                 295                 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                325                 330                 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
            340                 345                 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        355                 360                 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    370                 375
```

<210> 76
<211> 377
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G4344

<400> 76

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
            100                 105                 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
        115                 120                 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
    130                 135                 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145                 150                 155                 160

Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
```

165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
370 375

<210> 77
<211> 347
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G4344h1

<400> 77

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
  1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
             20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
         35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
     50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                 85                  90                  95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
            100                 105                 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
        115                 120                 125

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
    130                 135                 140

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
145                 150                 155                 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
                165                 170                 175
```

```
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
            180                 185                 190

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
        195                 200                 205

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
    210                 215                 220

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
225                 230                 235                 240

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
                245                 250                 255

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
            260                 265                 270

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
        275                 280                 285

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    290                 295                 300

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
305                 310                 315                 320

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                325                 330                 335

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
            340                 345
```

<210> 78
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G4344uh

<400> 78

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Leu Met Ile Ser
50 55 60

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
65 70 75 80

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
85 90 95

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
100 105 110

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
115 120 125

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
130 135 140

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
145 150 155 160

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
165 170 175

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
180 185 190

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
195 200 205

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
210 215 220

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
225 230 235 240

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
245 250 255

Lys

<210> 79
<211> 332
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G4344uhm

<400> 79
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

115 120 125

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
130 135 140

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
145 150 155 160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
165 170 175

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
180 185 190

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
195 200 205

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
210 215 220

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
225 230 235 240

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
245 250 255

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
260 265 270

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
275 280 285

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
290 295 300

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
305 310 315 320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325 330

<210> 80
<211> 327
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: G4PE

<400> 80

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175
```

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 81
<211> 1425
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm H chain

<400> 81
atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctattt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaata gtggtagcat aggctatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa aaatctatgg 360
ttcggggagt tccgttactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 420
tcctcagcta gcaccaaggg gccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 480
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 660
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 720
gagtccaaaa ccccacttgg tgacacaact cacacatgcc caccatgccc agcacctgag 780
ttcgaggggg gaccatcagt cttcctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc 840
tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 900
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 960
gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1020
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1080
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca 1140
tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac 1200
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac 1320
aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380
aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatga 1425

<210> 82
<211> 474
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm H chain

<400> 82
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr
115 120 125

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
225 230 235 240

Glu Ser Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
465 470

<210> 83
<211> 711

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm L chain

<400> 83
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgttg a 711

<210> 84
<211> 236
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm L chain

<400> 84
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:7-10VL_V104L (mutant)

<400> 85

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:7-10VL_G100Q (mutant)

<400> 86

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 87
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:7-10VL_A43V (mutant)

<400> 87

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 88
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:7-10VL_Y94F (mutant)

<400> 88

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<222> 9..9
<223> Xaa is Ala or Thr

<400> 89

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<222> 8..8
<223> Xaa is Leu, Tyr or Trp

<400> 91

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr
1 5

<210> 92
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

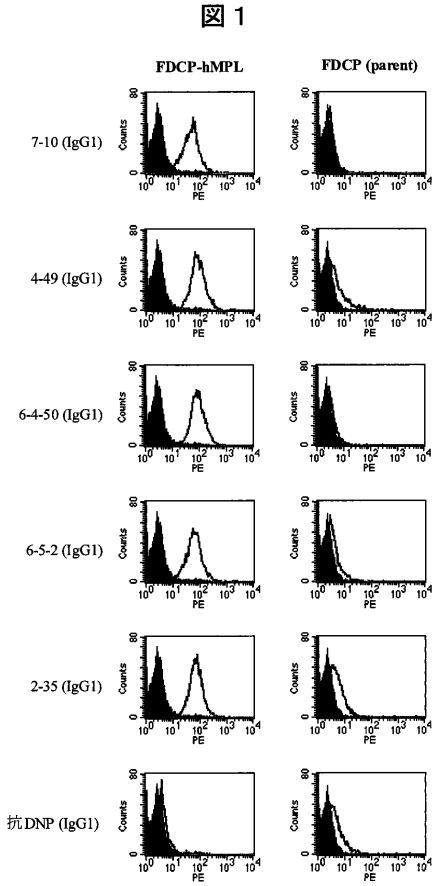
<210> 94
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

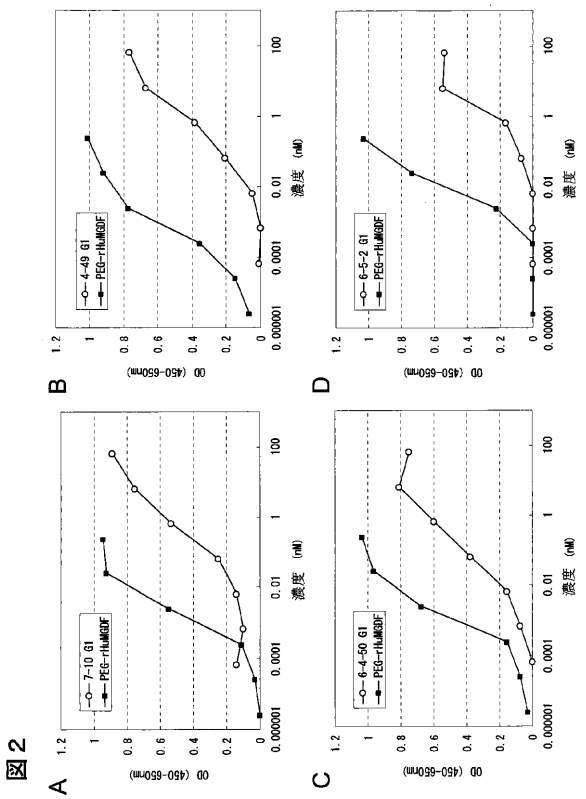
<400> 94

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

【図１】

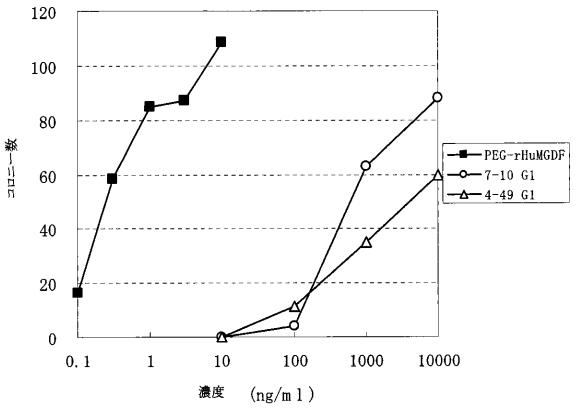


【図２】



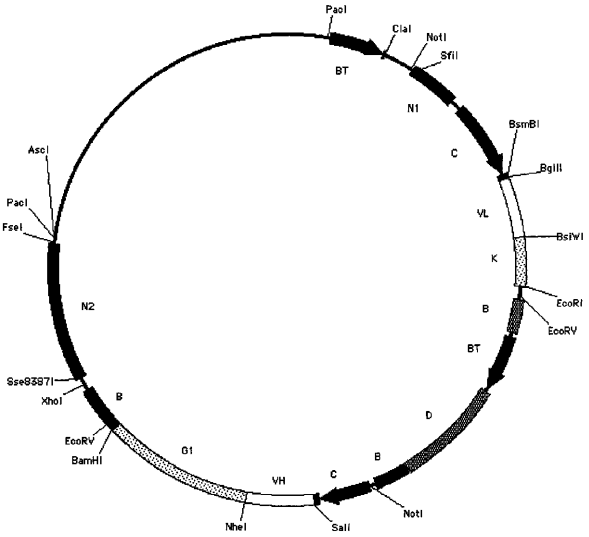
【図３】

図３



【図４Ａ】

図４Ａ



【図４Ｂ】

図４Ｂ

	CH1	アッパーヒンジ	ミドルヒンジ	CH2
IgG1	VDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG2	VDKTV	ERK	CCVECPPCP	APPVAGP
IgG3	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3	APELLGGP
IgG4	VDKRV	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP
G4PE	VDKRV	ESKYGPP	CPPCP	APEFEGGP
G4344	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3	APEFEGGP
G4344h1	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	APEFEGGP
G4344uh	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APEFEGGP
G4344uhm	VDKRV	ESKTPLGDTTHT	CPPCP	APEFEGGP

【図４Ｃ－１】

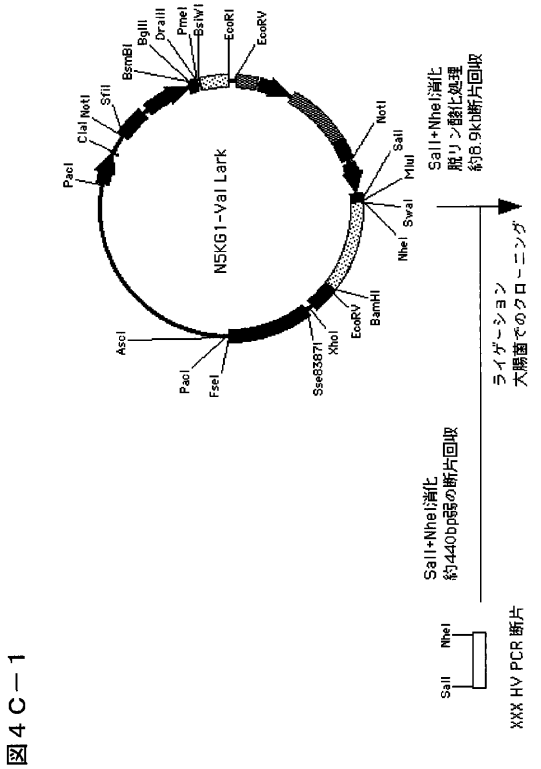


図４Ｃ－１

【図４Ｃ－２】

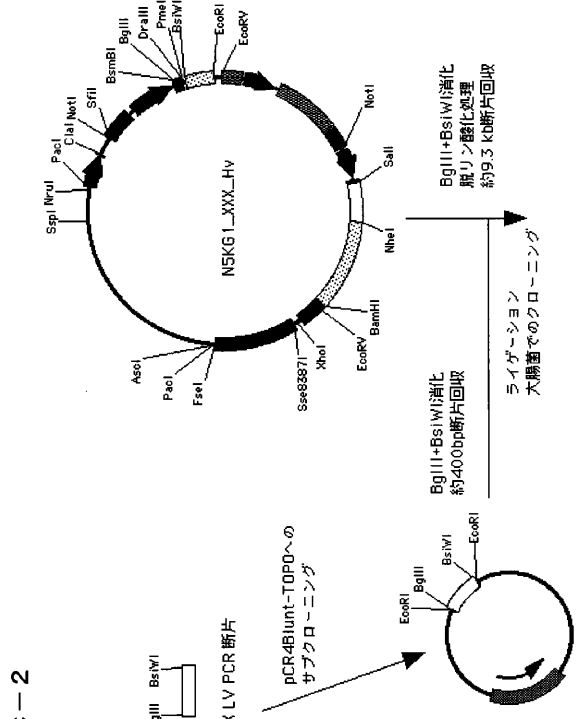


図４Ｃ－２

【図４Ｃ－３】

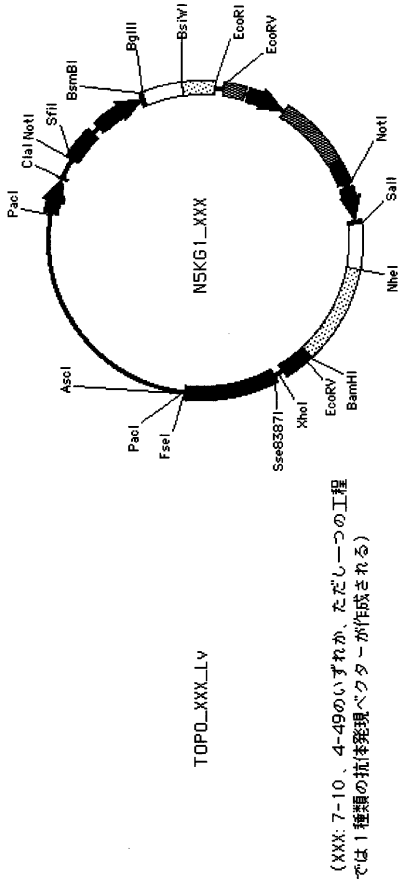


図４Ｃ－３

【図４Ｄ－１】

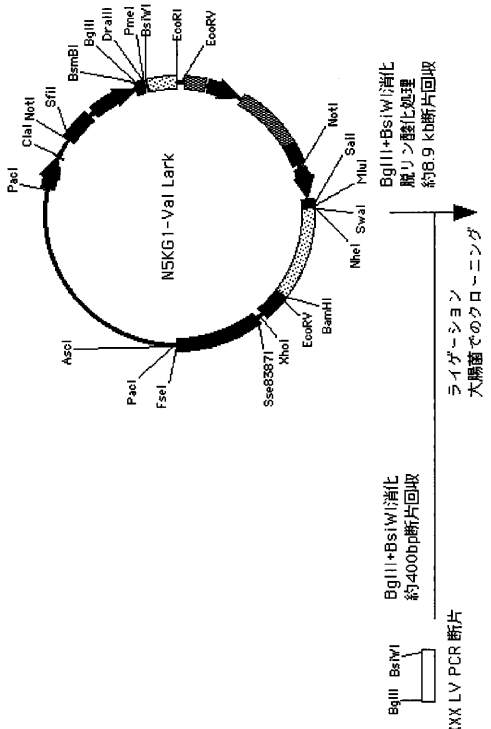


図４Ｄ－１

【図４Ｄ－２】

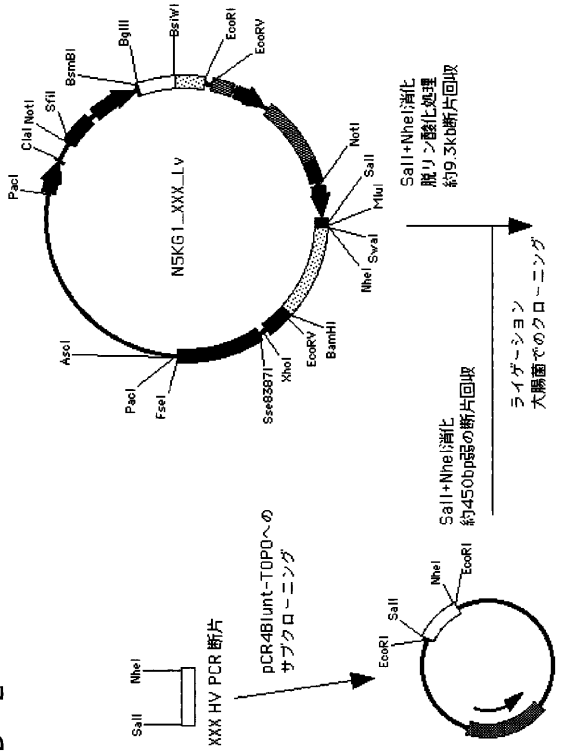


図４Ｄ－２

【図４Ｄ－３】

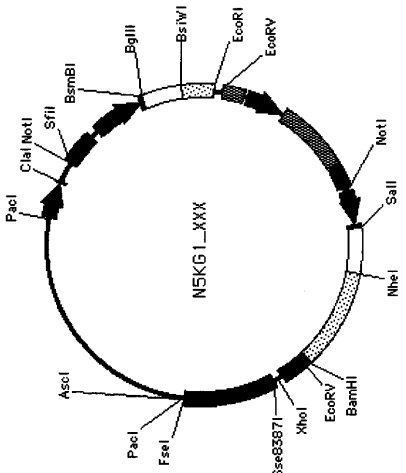


図４Ｄ－３

（XXX：6-4-50、6-5-2のいずれか、ただし一つの工程では１種類の抗体発現ベクターが作成される）

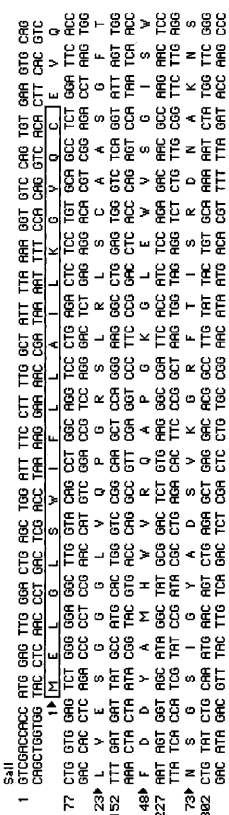
【図４Ｅ】

図４Ｅ

```
G3344h1  ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G3344    ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G4344    ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G4344h1  ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G4344uh  ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G4344uhm ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G4PE     ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

G3344h1  GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
G3344    GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
G4344    GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
G4344h1  GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
G4344uh  GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCP------
G4344uhm GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKTPLGDTTHTCPPCP------
G4PE     GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP------CPPCP------

G3344h1  DTPPPCPRCP----------------------------------APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
G3344    DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
G4344    DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
G4344h1  DTPPPCPRCP----------------------------------APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
G4344uh  ------------------------------------------APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
G4344uhm ------------------------------------------APEFEGGPSVFLFPPKPKDT
G4PE     ------------------------------------------APEFEGGPSVFLFPPKPKDT

G3344h1  LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
G3344    LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
G4344    LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
G4344h1  LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
G4344uh  LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
G4344uhm LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
G4PE     LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH

G3344h1  QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
G3344    QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
G4344    QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
G4344h1  QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
G4344uh  QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
G4344uhm QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
G4PE     QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

G3344h1  GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
G3344    GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
G4344    GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
G4344h1  GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
G4344uh  GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
G4344uhm GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
G4PE     GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE

G3344h1  ALHNHYTQKSLSLSLGK
G3344    ALHNHYTQKSLSLSLGK
G4344    ALHNHYTQKSLSLSLGK
G4344h1  ALHNHYTQKSLSLSLGK
G4344uh  ALHNHYTQKSLSLSLGK
G4344uhm ALHNHYTQKSLSLSLGK
G4PE     ALHNHYTQKSLSLSLGK
```

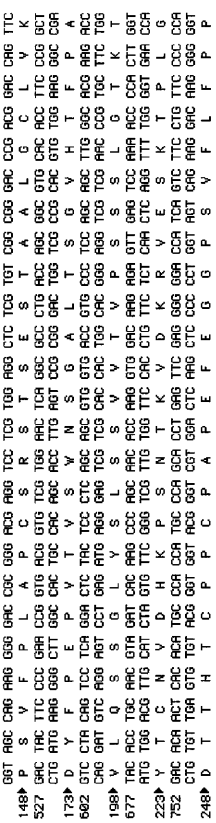
【図４Ｆ－１】

図４Ｆ－１



【図４Ｆ－２】

図４Ｆ－２



【図４Ｇ】

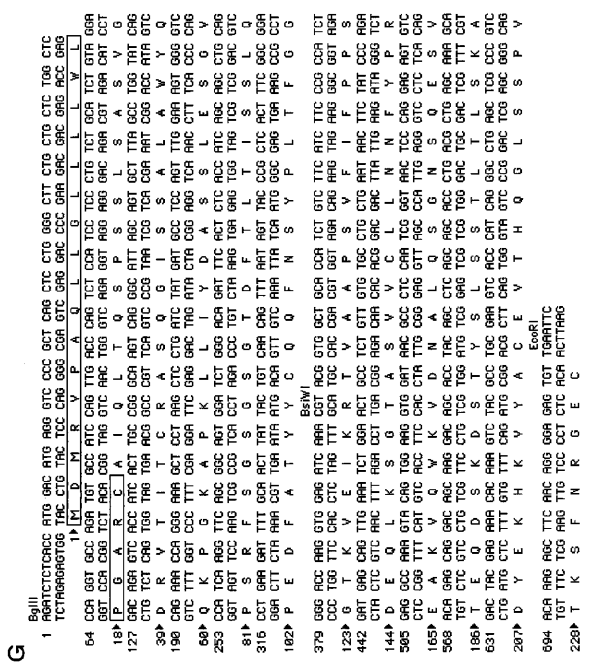


図４Ｇ

【図５】

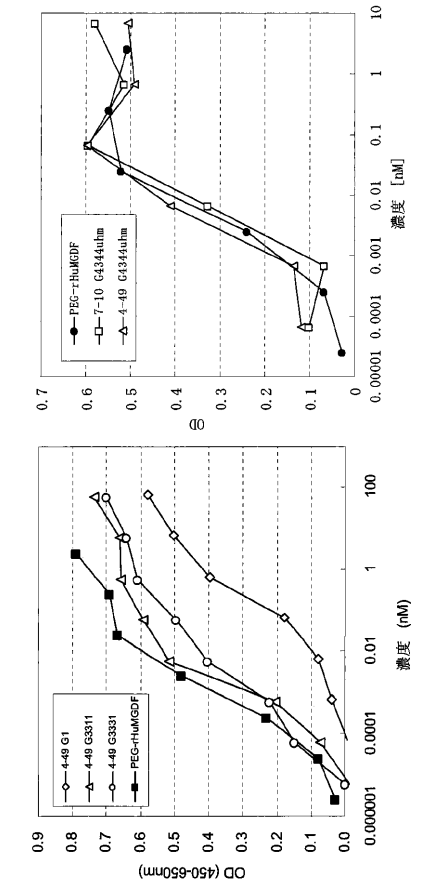
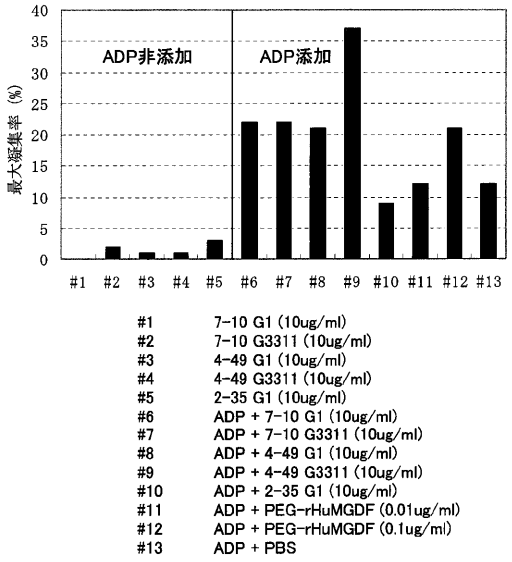


図５

【図７】



#1 7-10 G1 (10ug/ml)
#2 7-10 G3311 (10ug/ml)
#3 4-49 G1 (10ug/ml)
#4 4-49 G3311 (10ug/ml)
#5 2-35 G1 (10ug/ml)
#6 ADP + 7-10 G1 (10ug/ml)
#7 ADP + 7-10 G3311 (10ug/ml)
#8 ADP + 4-49 G1 (10ug/ml)
#9 ADP + 4-49 G3311 (10ug/ml)
#10 ADP + 2-35 G1 (10ug/ml)
#11 ADP + PEG-rHuMGDF (0.01ug/ml)
#12 ADP + PEG-rHuMGDF (0.1ug/ml)
#13 ADP + PBS

図７

【図８】

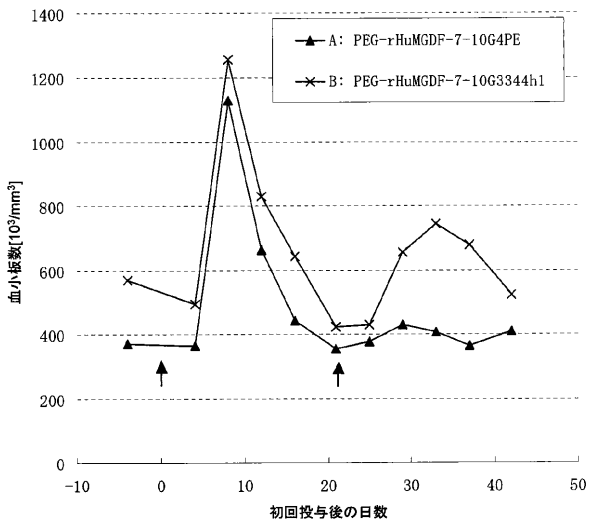


図８

【図９Ａ】

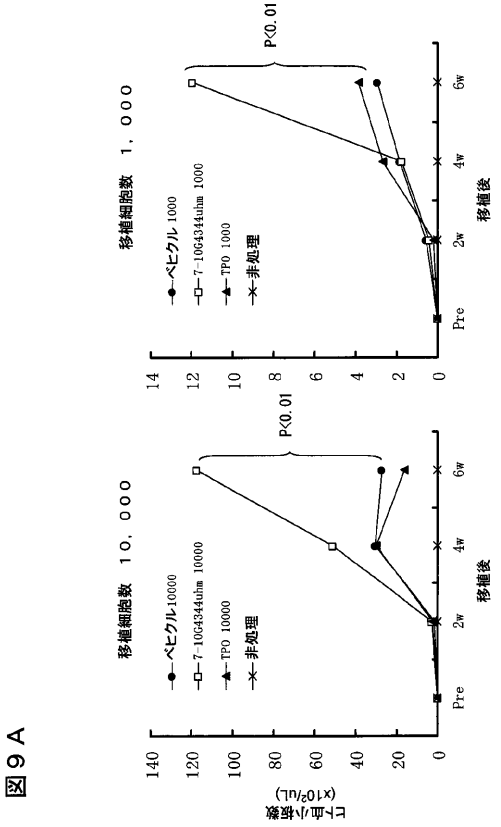


図９Ａ

【図９Ｂ】

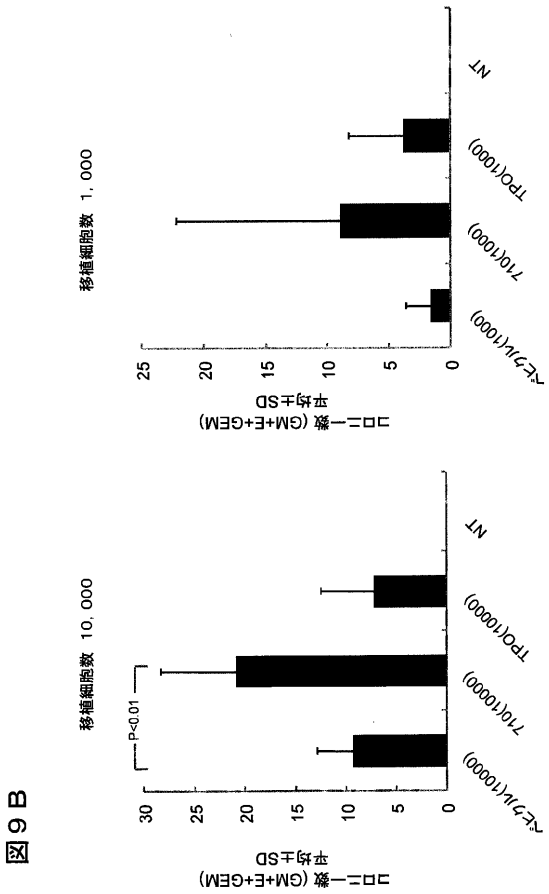


図９Ｂ

【図９Ｃ】

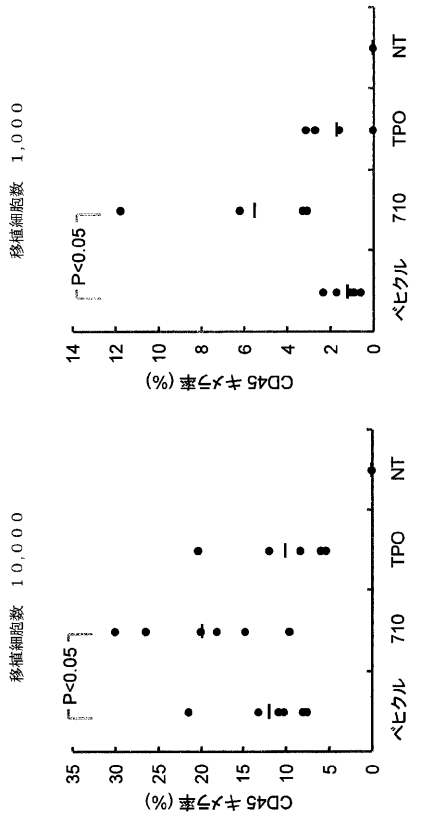


図９Ｃ

【図１０】

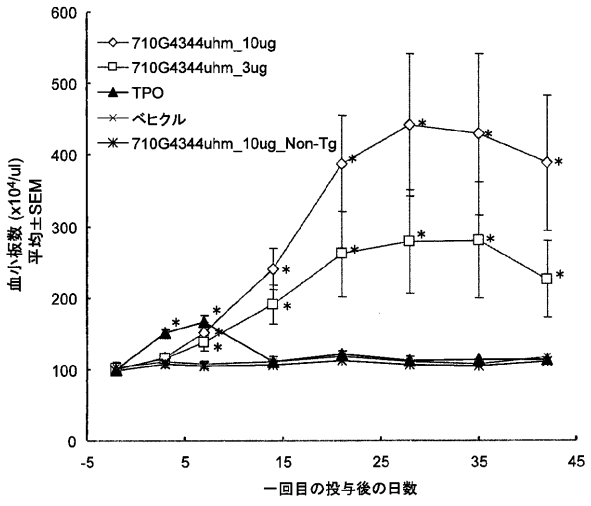
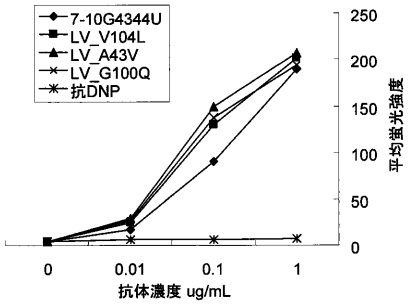


図１０

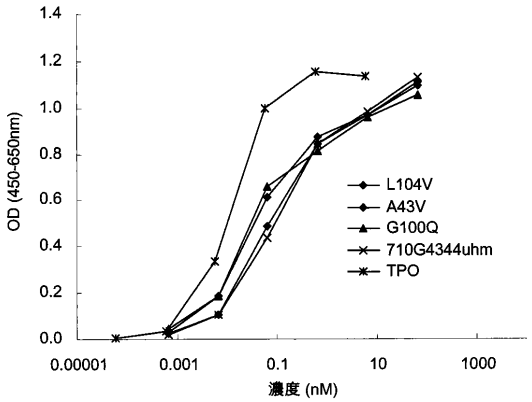
【図１１】

図１１



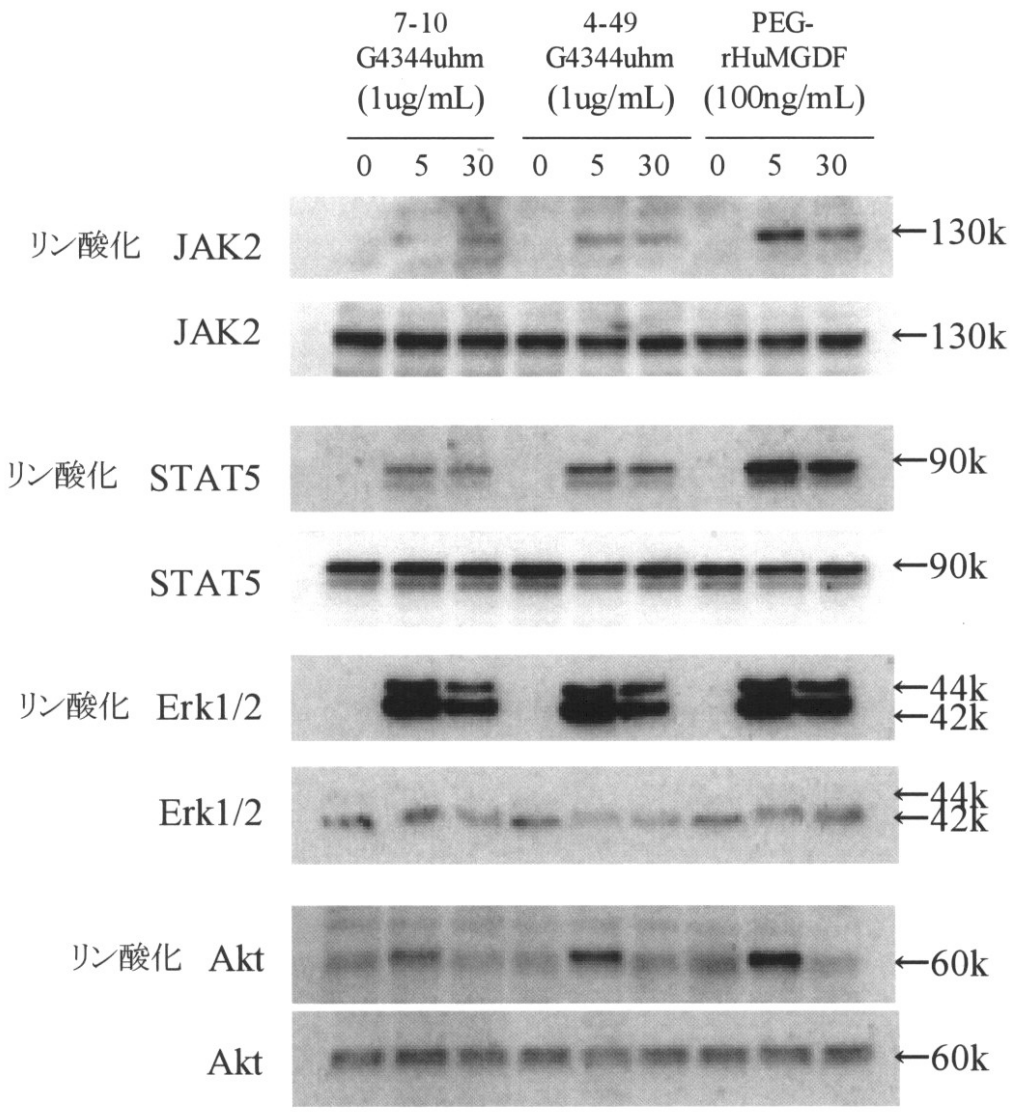
【図１２】

図１２



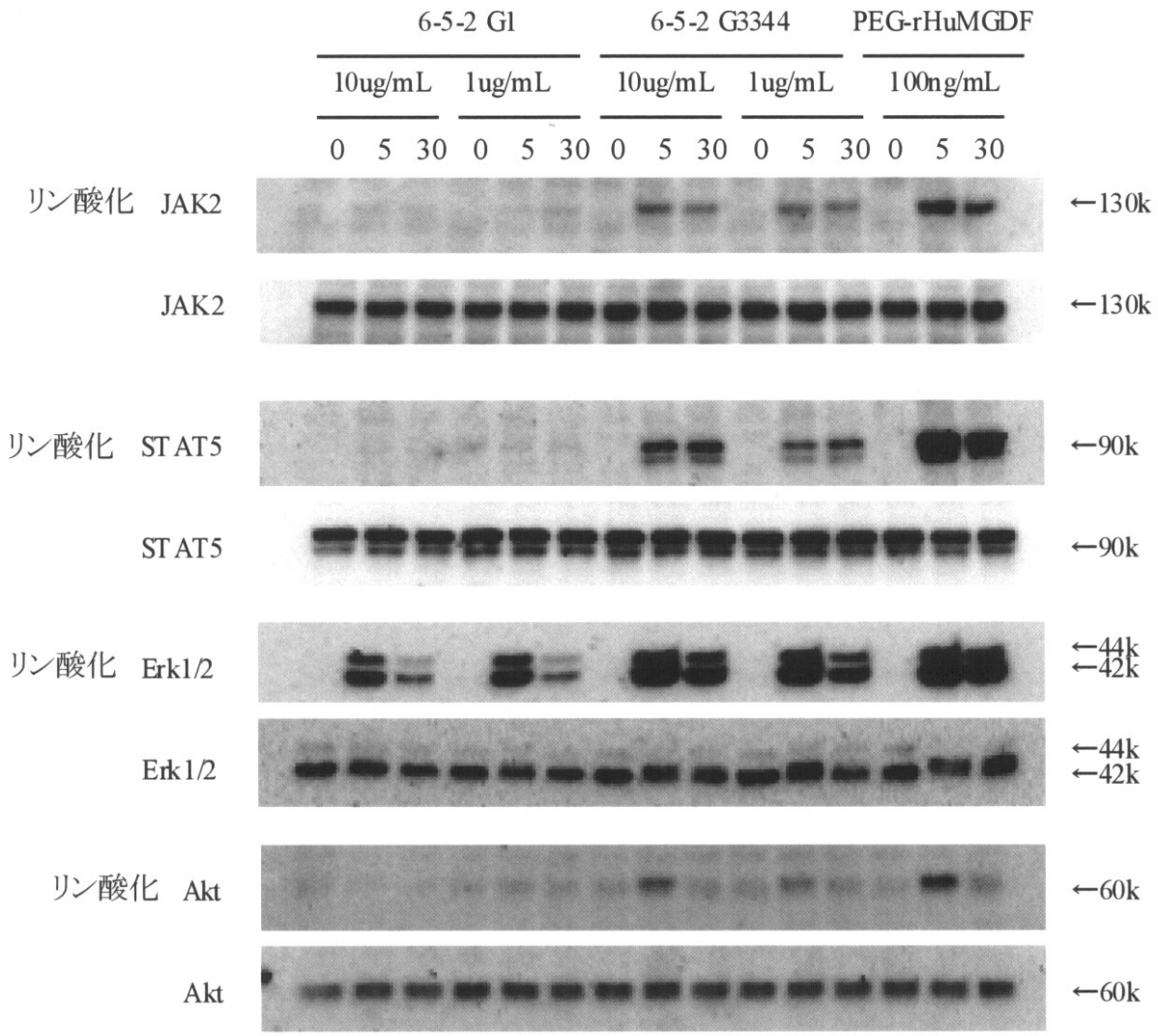
【図６Ａ】

図６Ａ


7-10
G4344uhm
(1ug/mL)
4-49
G4344uhm
(1ug/mL)
PEG-
rHuMGDF
(100ng/mL)
0 5 30 0 5 30 0 5 30
リン酸化 JAK2
JAK2
リン酸化 STAT5
STAT5
リン酸化 Erk1/2
Erk1/2
リン酸化 Akt
Akt
←130k
←130k
←90k
←90k
←44k
←42k
←44k
←42k
←60k
←60k

【図６Ｂ】

図６Ｂ



【手続補正書】
【提出日】平成20年7月28日(2008.7.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】

抗体の定常領域が、以下の(1)～(3)：
(1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
(2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
(3) 前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
のいずれかのアミノ酸配列であって、該重鎖定常領域のヒンジ領域のアッパーヒンジ部の配列がELKTPLGDTTHT（配列番号10）若しくはESKTPLGDTTHT（配列番号11）から選択され、ミドルヒンジ部の配列がCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3、CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP、CPSCP、CPRCP若しくはCPPCPから選択される前記アミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び(b)：
(a) ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのN末端がペグ(PEG)化された配列番号１のアミノ酸配列からなる下記の構造：
PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH
を有するPEG-rHuMGDFの50%以上であり、且つ50％有効濃度(EC50)が100nM以下であること、
の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体。
【請求項２】
以下の(a)及び(b)：
(a) ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、1,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの70%以上であり、且つEC50が10nM以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
以下の(a)及び(b)：
(a) ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、100ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの90%以上であり、かつEC50が1nM以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
以下の(1)～(8):
(1) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(2) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号５で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(3) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(4) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(5) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号３で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(6) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号５で示される

アミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(7) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び
(8) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する、請求項１に記載の抗体。

【請求項５】

ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体。

【請求項６】

重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の(1)及び(2)：
(1) 配列番号10で示されるアミノ酸配列、及び
(2) 配列番号11で示されるアミノ酸配列、
のアミノ酸配列から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列においてKabat EU番号付けにおける228位セリンがプロリンに且つ235位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、請求項４に記載の抗体。

【請求項７】

以下の(1)～(8)：
(1) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(2) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(3) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(4) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(5) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(6) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(7) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、及び
(8) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
からなる群から選択される、請求項６に記載の抗体。

【請求項８】

請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項９】

請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板増多剤。

【請求項１０】

骨髄移植又は臍帯血移植時の血小板回復促進用である、請求項９に記載の血小板増多剤

。
【請求項１１】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤。
【請求項１２】
血小板減少症が、以下の(1)～(6)：
(1) 特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、
(2) 癌化学療法後の血小板減少症、
(3) 再生不良性貧血、
(4) 骨髄異形性症候群（MDS）、
(5) 肝疾患にともなう血小板減少症、及び
(6) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症、
からなる群から選択される疾患のいずれか１つである、請求項１１に記載の血小板減少症治療剤。
【請求項１３】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む、造血幹細胞移植後の血球回復促進用の血球増多剤。
【手続補正書】
【提出日】平成20年10月27日(2008.10.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体の定常領域が、以下の(1)～(3)：
(1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
(2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
(3) 前記(1)又は(2)のアミノ酸配列において１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、
のいずれかのアミノ酸配列であって、該重鎖定常領域のヒンジ領域のアッパーヒンジ部の配列がELKTPLGDTTHT（配列番号10）であり、ミドルヒンジ部の配列がCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3、CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP若しくはCPRCPである前記アミノ酸配列を有するか、あるいは該重鎖定常領域のヒンジ領域のアッパーヒンジ部の配列がESKTPLGDTTHT（配列番号11）であり、ミドルヒンジ部の配列がCPPCPである前記アミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び(b)：
(a) ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのN末端がペグ(PEG)化された配列番号１のアミノ酸配列からなる下記の構造：
PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH
を有するPEG-rHuMGDFの50%以上であり、且つ50％有効濃度（EC50）が100nM以下であること、
の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体。
【請求項２】
以下の(a)及び(b)：

(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、1,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b)UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの70%以上であり、且つEC50が10nM以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
以下の(a)及び(b)：
(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、100ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b)UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの90%以上であり、かつEC50が1nM以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
以下の(1)～(8):
(1) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(2) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号５で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(3) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(4) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(5) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号３で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(6) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号５で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(7) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び
(8) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項５】
ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項６】
重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の(1)及び(2)：
(1) 配列番号10で示されるアミノ酸配列、及び
(2) 配列番号11で示されるアミノ酸配列、
のアミノ酸配列から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列においてKabat EU番号付けに基づく228位のセリンがプロリンに且つ235位のロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、請求項４に記載の抗体。
【請求項７】
以下の(1)～(8)：

(1) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(2) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(3) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(4) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(5) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(6) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(7) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、及び
(8) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
からなる群から選択される、請求項６に記載の抗体。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。
【請求項９】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板増多剤。
【請求項１０】
骨髄移植又は臍帯血移植時の血小板回復促進用である、請求項９に記載の血小板増多剤。
【請求項１１】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤。
【請求項１２】
血小板減少症が、以下の(1)～(6)：
(1) 特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、
(2) 癌化学療法後の血小板減少症、
(3) 再生不良性貧血、
(4) 骨髄異形性症候群（MDS）、
(5) 肝疾患にともなう血小板減少症、及び
(6) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症、
からなる群から選択される疾患のいずれか１つである、請求項11に記載の血小板減少症治療剤。
【請求項１３】
請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む、造血幹細胞移植後の血球回復促進用の血球増多剤。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は、ヒトトロンボポエチン受容体（別名：ヒトc-Mpl）に対するアゴニスト抗体に関する。
さらに本発明は、抗ヒトc-Mplアゴニスト抗体を有効成分とする、臨床上血小板を増多させる必要のある患者／疾患に対する治療剤、特に血小板減少症治療剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
＜TPOとTPO受容体について＞
トロンボポエチン（Thrombopoietin：TPO）は、生体内で巨核球および血小板の増殖を促進する造血因子である。ヒトTPOは全長332アミノ酸残基からなる糖タンパク質であり、その活性にはN末端側の配列が重要であることが知られている。細胞膜上のTPO受容体と結合することで機能を発揮する。
【０００３】
c-Mplは、現在知られている唯一のTPO受容体である。ヒトc-Mplは、シグナルペプチドを含むと635アミノ酸、成熟型は610アミノ酸からなる膜一回貫通型糖タンパク質であり、I型のサイトカイン受容体ファミリーに属している。ヒトc-MplのメッセンジャーRNAおよびタンパク質の配列は既に報告されている（Genbank: NM_005373, NP_005364参照）。同じファミリーの分子としてエリスロポエチン受容体（EpoR）や、G-CSF受容体（G-CSFR）、インターロイキン３受容体（IL-3R）などを挙げることができる。ヒトc-Mplは細胞外に２つのCRH（Cytokine Receptor Homologue）ドメイン（N末端側からCRH1, CRH2と呼ばれる）を持ち、そのなかにサイトカイン受容体ファミリーに特徴的なWSXWSモチーフを含んでいる。細胞内ドメインにはBox1, Box2と呼ばれる二つの配列があり、これらはシグナル伝達に必須である。TPOはCRH1に結合し、c-Mplを二量体化することでシグナルを入れると考えられているが、詳細な結合および活性化の様式は解明されていない。c-Mplが二量体化すると、細胞内ドメインに結合したシグナル伝達キナーゼが活性化され、リン酸化シグナルが細胞内に伝えられる。TPO-MplシグナルによってJak-STAT, PI3K-Akt, Ras-MAPKの各経路が動かされることが知られている。TPOまたはc-Mplを欠損したマウスは、血小板数が野生型マウスの10-20％程度まで減少することが報告されており、TPO-Mplシステムが血小板数を調節する主要なシステムであることを示している。c-Mplの発現は、巨核球のみならず、さらに未分化な造血前駆細胞や造血幹細胞にも認められる。骨髄中のc-Mpl陽性細胞画分は、c-Mpl陰性画分に比べ、高い骨髄再構築能を持っていることが示されており、また、c-Mpl欠損マウスでは巨核球・血小板だけではなく造血幹細胞も減少していることが判っている （非特許文献１，２参照）。これらの知見から、TPO-Mplシステムが造血系に幹細胞レベルから関与していることが示唆されている。
【０００４】
TPOがクローニングされて以来、血小板減少症の治療薬としての利用が期待され、これまでに二種類の組換え型TPOの臨床試験が行われている（非特許文献３参照）。完全長のヒトTPO（rhTPO）と、ヒトTPOの活性部位であるN末端側163アミノ酸のペプチド配列をポリエチレングリコール（PEG）化したPEG-rHuMGDF（Pegylated Recombinant Human Megakaryocyte Growth and Development Factor）である。臨床試験において、これらの組換え型TPOは健常人および特発性血小板減少性紫斑病（Idiopathic Thrombocytopenic Purpura：ITP）患者の血小板を増加させることに成功している。また、骨髄非破壊的な化学療法に伴う血小板減少症を軽減させる効果が示されている。さらに、例数は少ないながらも、再生不良性貧血（Aplastic Anemia：AA）、骨髄異形成症候群（Myelodysplastic Syndrome：MDS）の患者に対しても組換え型TPOの有効性が報告されている（非特許文献４，５）。
【０００５】
＜c-Mplアゴニスト抗体について＞
TPOと同様にc-Mplを介してシグナルを入れる性質を持ちながら、分子としては全く異なる種々のTPOミメティクスが研究されている（非特許文献６，７参照）。ミメティクスに

は大きく分けて、ペプチド性低分子、非ペプチド性低分子、抗体由来分、アゴニスト抗体などが知られている。

【０００６】

公知の抗c-Mplアゴニストヒト抗体として、12B5, 12E10, 12D5（特許文献１参照）を挙げることができる。これらは全長抗体（Whole antibody、 例えばWhole IgG）の形態でプライマリーヒト細胞に対する活性を持たない。なお、本明細書で使用するプライマリーヒト細胞とは、TPOに対して高感受性を有する樹立された特殊な株化細胞やTPO受容体遺伝子を遺伝子組換え技術により導入し該受容体を高発現させた細胞ではなく、ヒト臍帯血やヒト骨髄由来のCD34＋細胞等の本来生体内でTPOの作用対象となっている細胞を意味する。

【０００７】

また、公知のアゴニストマウス抗体として、BAH-1(特許文献２, 非特許文献８参照), VB22B (特許文献３参照)を挙げることが出来るが、マウス抗体はヒト血中において抗原性を示すことが知られており、医薬品としての利用には適さない。また、一般に、アゴニスト抗体を、全長抗体で、例えばCDR grafting等の方法を用いて、その活性を保ったままヒト化することは困難である（特許文献３, 非特許文献９参照）。従って、上記のような公知のアゴニスト抗体が存在するとしても、プライマリー細胞に作用するアゴニストヒト抗体の創出は容易ではない。

【０００８】

また前述のTPOミメティクスで述べた抗体由来の低分子も、ある種のアゴニスト抗体であり、抗体の一部を利用改変したDiabody,一本鎖$(Fv)_2$（$sc(Fv)_2$）が報告されている（特許文献１, ３参照）。しかしながら、この方法によって作出された改変抗体は、分子の大幅な改変による抗原性が懸念されるうえ、全長抗体に比べ血中半減期が短縮される等、医薬品として利用するためには課題が多い。

【０００９】

以上、全長抗体は低抗原性や血中半減期の長さ等、医薬品として有用な性質を備えている一方、上述のように、全長抗体で充分な活性を持つアゴニストヒト抗体を作製するのは容易ではない。

【００１０】

そこで、以下に述べるように、本発明者らは、抗体の構造に大幅な改変を加えることなく、充分な活性を持ったアゴニストヒト抗体の取得を試み、その取得に至った。さらに抗体のヒンジ領域に改変を加え、アゴニスト活性を増強することに成功した。本発明によって作出された抗体は血小板減少症治療薬としての利用に適していると考えられる。

【００１１】

【非特許文献１】宮崎洋,「トロンボポエチンの将来展望」, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 46(3) , 311-316, 2000

【非特許文献２】Murone Mら, Stem Cell 16:1-6, 1998

【非特許文献３】Kuter DJら, Blood 100(10):3457-69, 2002

【非特許文献４】Yonemura Yら, Int J Hemat (82) 307-309, 2005

【非特許文献５】Komatsu Nら, Blood 96 296a, 2000

【非特許文献６】Broudy VCら, Cytokine. 25(2):52-60, 2004

【非特許文献７】Wang Bら, Clin Pharmacol Ther. 76(6):628-38, 2004

【非特許文献８】Deng Bら, Blood 92(6):1981-1988, 1998

【非特許文献９】Ji Hee Sonら, Journal of Immunological Methods 286:187-201, 2004

【００１２】

【特許文献１】国際公開第WO 99/10494号パンフレット

【特許文献２】国際公開第WO 99/03495号パンフレット

【特許文献３】国際公開第WO 2005/056604号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

本発明の目的は、新規な抗ヒトc-Mplアゴニスト抗体を提供することである。

本発明において、抗体とは、これまで全長抗体では困難であった、ヒトc-Mplに対し天然のリガンドであるTPOとほぼ同等のシグナルを入れることができ、プライマリーヒト細胞に対する増殖刺激活性を有する抗体である。

【００１４】

本発明の第２の目的は、抗体の断片化を行わずにアゴニスト抗体の活性を高める技術を提供することにより、抗体分子が本来持つ長半減期、低抗原性といった医薬品として望ましい性質を有する新規な抗ヒトc-Mplアゴニスト抗体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

上記課題を解決するため、本発明者らは、抗ヒトc-Mplアゴニスト抗体の研究に鋭意取り組んだ。その結果、全長抗体で、天然リガンドとほぼ同等のシグナルを生じ、ヒトプライマリー細胞に対する活性を有するヒト抗体を取得した。また、取得したアゴニスト抗体につき更に鋭意検討を行い、抗体の断片化を行わずにそのアゴニスト活性を高める改変方法を見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の特徴を含む。

【００１６】

１．ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体

本発明にかかるヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体は、以下の(1)～(6)に示す抗体を含む。

（１）抗体の定常領域が以下の(i)～(iii)：

(i)　ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、

(ii)　ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは

【００１７】

(iii) 前記(i)又は(ii)のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列、

のいずれかのアミノ酸配列を有し、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び／又は(b)：

(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、

(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、活性が下記の構造を有するPEG-rHuMGDFの50%以上であり、かつ50％有効濃度（EC50）が100nM以下であること、

の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体。

【００１８】

本明細書中、ヒト抗体サブクラスは、IgG1，IgG2，IgG3及びIgG4を含む。ヒトイムノグロブリンの定常領域等の配列は、例えばNCBIホームページ（GenBank、UniGeneなど）から入手可能であり、例えばヒトIgG1重鎖定常領域については登録番号J00228、ヒトIgG2重鎖定常領域については登録番号J00230、ヒトIgG3重鎖定常領域については登録番号X03604、ヒトIgG4重鎖定常領域については登録番号K01316、ヒト軽鎖κ定常領域については登録番号V00557，X64135，X64133など、ヒト軽鎖λ定常領域については登録番号X64132，X64134などを含むことができる。

【００１９】

本明細書中、ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法とは、後述の実施例６に記載した測定法を意味し、コロニー形成に必要な抗体の濃度は、この測定法に基づき求めることができる。

本明細書中、UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法とは、後述の実施例５に記載した測定法を意味し、増殖活性及びEC50はこの測定法に基づき求めることができる。

【００２０】

本明細書中、PEG-rHuMGDFとは、ヒトTPOのアミノ末端受容体結合ドメインを含むトラン

ケート化タンパク質をコードするcDNAを含有するプラスミドで形質転換された大腸菌（E. coli）を使用して産生される（Ulichら, Blood 86:971-976 (1995)）ポリペプチドを抽出し、リフォールディングし、精製し、そのアミノ末端にポリエチレングリコール（PEG）部分を共有結合させた配列番号１のアミノ酸配列を有する分子であり、以下の構造：
PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEG
VMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVR
RAPPTTAVPS-COOH
を有するものである。

【００２１】

本明細書中、ヒトc-Mplを活性化するとは、ヒトc-Mplを発現している細胞においてヒトc-Mplに係る細胞内シグナル伝達を起こすことをいう。

本明細書中、数個なる用語は、２～約10個、例えば２～９個、２～8個、２～７個、２～６個、２～５個、２～４個、又は２～３個の整数を意味する。

【００２２】

（２）上記コロニー形成測定法によりコロニー形成を誘導する活性を有し、及び／又は、上記UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法により細胞増殖活性を有する抗体のうち、コロニー形成活性については10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導する活性を有する、好ましくは1,000ng/mL以下の濃度で該活性を有する、より好ましくは100ng/mL以下の濃度で該活性を有する上記（１）の抗体。

【００２３】

（３）上記細胞増殖活性がPEG-rHuMGDFの50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上の活性を示し、50%有効濃度（EC50）が、100nM以下, 好ましくは10nM以下、より好ましくは1nM以下のものである上記（１）の抗体。

【００２４】

（４）上記コロニー形成測定法及び上記増殖能測定法の両者の測定方法によりそれぞれ以下の活性を示す上記（１）の抗体。

(i) 以下の(a)および(b)の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体に対するアゴニスト抗体。

(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、10,000 ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が下記の構造を有するPEG-rHuMGDFの50%以上であり、かつ50％有効濃度（EC50）が100nM以下である。

【００２５】

(ii) 以下の(a)および(b)の性質を有する、ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体。

(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、1,000 ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの70%以上であり、かつEC50が10nM以下である。

【００２６】

(iii) 以下の(a)および(b)の性質を有する、ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体。

(a) ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、100 ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導する。

(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの90%以上であり、かつEC50が1nM以下である。

【００２７】

（５）以下の（a）～（h）からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列可変領域及び軽鎖アミノ酸配列可変領域を有する上記（１）の抗体。（カッコ内に、各可変領域配列が由来する後述実施例の抗体の名称を示す。）

(a) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：7-10）

(b) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号５で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：4-49）
(c) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：6-4-50）
(d) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。（抗体の名称：6-5-2）
【００２８】
(e) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号３で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列
を含む軽鎖可変領域。
(f) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号５で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
(g) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
(h) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
【００２９】
（６）ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、上記（１）～（５）に記載の抗体。
【００３０】
２．重鎖改変アゴニスト抗体
本発明に係る重鎖改変アゴニスト抗体とは、以下のものを含む。
（１）重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の(a)～(b)のアミノ酸配列から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側がヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列においてADCC（抗体依存性細胞障害）活性等に係るアゴニスト抗体として好ましくない性質に関する部位を変異させたアミノ酸配列を有するアゴニスト抗体。
(a) 配列番号10で示されるアミノ酸配列。
(b) 配列番号11で示されるアミノ酸配列。
【００３１】
本明細書の中で用いるアッパーヒンジ（Upper hinge）とは、Kabat EU 番号付け（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991)）による表記で216位以降、226位よりN末端側の配列を指す。ミドルヒンジ（Middle hinge）とは、同表記で226位以降、231位よりN末端側の配列を指す。ヒトイムノグロブリンG4を含む各サブタイプにつき、アッパーヒンジ、ミドルヒンジ及びその前後のアミノ酸配列を図４Bに示す。図中、CH1はアッパーヒンジに隣接するCH1領域の一部、CH2はCH2領域中のローワーヒング(lower hinge)と称される部分である。
【００３２】
（２）上記重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側が、ヒトイムノグロブリンＧ４のアミノ酸配列において、Kabat EU番号付けにおける228位セリンがプロリンに且つ235位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体。
【００３３】
（３）以下の(i)又は(ii)に示された、ヒトc-Mplに対するアゴニストヒト抗体である上記（２）の重鎖改変抗体。
(i) 重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が以下の(a)～(b)のアミノ酸配列から選択されるい

ずれか一つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側がヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列においてKabat EU番号付けにおける228位セリンがプロリンに且つ235位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する重鎖を含むヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体。
(a) 配列番号10で示されるアミノ酸配列。
(b) 配列番号11で示されるアミノ酸配列。
【００３４】
(ii) 更に好ましい実施形態としては、以下（a）～（h)からなる群から選択される、上記(i)に記載のヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体を挙げることができる。
(a)配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番３のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
(b)配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
(c)配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
(d)配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
(e) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
【００３５】
(f) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
(g) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
(h) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体。
【００３６】
３．ヒトｃ-MPLに対するアゴニスト抗体の医薬用途及び医薬組成物
本発明に係るヒトｃ-MPLに対するアゴニスト抗体は、c-Mpl受容体に結合しそれを活性化する能力、および／または（インビボおよびインビトロの両方で）血小板の産生を刺激する能力（「血小板生成活性」）および血小板前駆体の産生を刺激する能力（「巨核球生成活性」）を有する。
本発明に係るヒトｃ-Mplに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物／医薬用途としては、具体的には次のものを挙げることができる。
【００３７】
（１）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかの抗体を有効成分とする医薬組成物。
（２）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかに記載の抗体を有効成分とする血小板増多剤。
（３）骨髄移植、臍帯血移植時の血小板回復促進用であることを特徴とする上記（２）に記載の血小板増多剤
（４）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかの抗体を有効成分とする血小板減少症治療剤。
【００３８】
（５）血小板減少症が、以下の（a）～（f）のいずれか１つである、上記（４）に記載の血小板減少症治療剤。

(a) 特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、
(b) 癌化学療法後の血小板減少症、
(c) 再生不良性貧血、
(d) 骨髄異形性症候群（MDS）、
(e) 肝疾患にともなう血小板減少症、又は
(f) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症。

【００３９】

（６）造血幹細胞移植後の血球回復促進用であるヒトc-Mplアゴニスト抗体を有効成分として含む血球増多剤。

（７）上記１．（１）～（６）及び同２．（３）のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む上記（６）に記載の血球増多剤。

【００４０】

４．本発明に係る抗体の製造方法

本発明の抗体は、本発明に係る抗体を産生するハイブリドーマを用いて抗体を製造してもよいし、又は、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を製造することもできる。本発明の抗体の製造方法として、好ましくは、以下の方法が挙げられる。

【００４１】

下記の(a)～(h)：
(a) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
(b) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
(c) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
(d) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
(e) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、

【００４２】

(f) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
(g) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、及び
(h) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする塩基配列、
からなる群から選択される、重鎖をコードする塩基配列を含むDNA及び軽鎖をコードする塩基配列を含むDNAと、それらのDNAの発現を制御する塩基配列を含む１又は複数のDNAとを保持する哺乳動物細胞を作製し、該哺乳動物細胞を培養した培養液から、該重鎖及び軽鎖からなる抗体をコードするDNAの発現産物を単離精製することを含む、ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体の製造方法。

【００４３】

５．本発明に係るDNA

本発明に係るDNAとして、以下のものを挙げることができる。

（１）ヒトMplに対するアゴニスト抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基

配列を含む新規なDNAであって、以下の(a)～(d)からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA:
(a) 配列番号２で示されるアミノ酸配列;
(b) 配列番号４で示されるアミノ酸配列;
(c) 配列番号６で示されるアミノ酸配列;
(d) 配列番号８で示されるアミノ酸配列。
【００４４】
（２）ヒトMplに対するアゴニスト抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む新規なDNAであって、以下の(a)～(h)からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA:
(a) 配列番号３で示されるアミノ酸配列;
(b) 配列番号５で示されるアミノ酸配列;
(c) 配列番号７で示されるアミノ酸配列;
(d) 配列番号９で示されるアミノ酸配列;
(e) 配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
(f) 配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
(g) 配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;
(h) 配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列。
【００４５】
（３）上記（１）又は（２）のDNAが、それぞれ可変領域及び定常領域を含む抗体重鎖或いは軽鎖をコードするDNA。
（４）抗体の重鎖定常領域のアッパーヒンジ部が、以下の(a)及び(b)のアミノ酸配列から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、並びに、該重鎖定常領域のミドルヒンジ部以降のC末端側がヒトイムノグロブリンG4のアミノ酸配列或いは該G4のアミノ酸配列においてKabat EU番号付けにおける２２８位セリンがプロリンに且つ２３５位ロイシンがグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列を有する、上記（３）に記載の抗体重鎖をコードするDNA。
(a) 配列番号10で示されるアミノ酸配列。
(b) 配列番号11で示されるアミノ酸配列。
【００４６】
本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2006-81322号、2006-299554号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。
【発明を実施するための最良の形態】
【００４７】
以下、本発明を詳細に説明する。
本発明は、プライマリーヒト細胞に作用する抗ヒトc-Mplアゴニストヒト抗体を提供する。
【００４８】
本発明における抗体は、ヒト抗体産生マウス（例えば、KMマウス™（キリンビール社））をヒトMpl組換えタンパク質もしくはヒトMpl発現細胞で免疫し、通常のモノクローナル抗体作製法にて単離することができる。また、ハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、発現ベクターを構築し、発現細胞を作製し、その過程で、種々の定常領域を有する組換え抗体を作製することができる。
【００４９】
１．本発明に係る抗体について
本明細書において抗体とは、Fab領域、ヒンジ領域、Fc領域を有する抗体を意味し、天

然に存在する抗体、及び、同様の構成を有する範囲において、それ自体公知の方法で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマにより産生される、或いは、一旦抗体遺伝子を取得しそれを用いて遺伝子工学的に産生される抗体、更に部位特異的突然変異誘発法により一部改変され遺伝子工学的に産生される抗体を含む。そして本発明に係るヒトｃMplに対するアゴニスト抗体及び重鎖改変アゴニスト抗体は前述した通りのものである。

【００５０】

一般に、アゴニスト抗体は細胞膜上の標的分子に結合し、複合体を形成させることでシグナルを伝える。ホモ二量体を形成するサイトカイン受容体ファミリー、例えばエリスロポエチン受容体（EpoR）、G-CSF受容体（G-CSFR）、トロンボポエチン受容体（c-Mpl）等に対するアゴニスト抗体は、二価の抗体が、二つの分子と結合することで二量体を形成させると考えられる。多くのアゴニスト抗体がFab断片のみでは活性を示さないこともそれを示唆している。

【００５１】

複合体形成には、二つの抗原結合部位が接近し易いことが重要と考えられる。全長抗体では充分な活性を持たない抗体でも、sc(Fv)$_2$等の形態に低分子化することでアゴニスト活性が上昇するのはこのことを示唆している。一方で、低分子化抗体は、分子の大幅な改変による抗原性が懸念されるうえ、血中半減期が短縮される等、医薬品として利用するためには課題が多い。全長抗体の持つ、低抗原性や血中半減期の長さ等、医薬品として有用な性質を生かすためには、抗体の構造に大幅な改変を加えることなく、高い活性を持ったアゴニスト抗体が望まれる。

【００５２】

後述の実施例２に示すように、本発明者らは、免疫の方法に工夫をこらし、全長抗体で高い活性を持った抗ヒトc-Mplアゴニスト抗体を取得した。工夫とは、例えば高発現細胞株による免疫や恒常活性型の変異受容体発現細胞を用いた免疫である。該アゴニスト抗体は後述の実施例６に記載のヒト臍帯血CD34+細胞を用いたコロニーアッセイでコロニー形成を誘導することが示されており、医薬品として有用であることが期待される。

【００５３】

さらに、本発明者らはヒンジ部分の柔軟性を高めることで、複合体形成の効率を高め、アゴニスト活性を増強することを考案した。柔軟性の高い配列は、例えばグリシンリンカーのような配列を考えることができる。もしくは、ヒトIgGの中でも、最も柔軟性が高いIgG3のヒンジ領域を用いることができる。抗体の低抗原性を損なわないためには、なるべく天然に存在する配列を用いることが望ましい。そこで、IgG3のヒンジ配列がより好ましい。

【００５４】

また、遺伝子工学的改変により、細胞傷害活性が低く、かつ、高いヒンジの柔軟性を持った、アゴニスト抗体に最適な定常領域として、ヒトIgG3のアッパーヒンジ領域を持ち、ミドルヒンジ以降C末端側の領域はヒトIgG4の配列とするような抗体の作製も可能である。

【００５５】

より具体的には、当業者に周知である遺伝子工学的改変（例えば、欧州特許EP314161公報を参照のこと）により異なるサブクラスのものに変換し、即ち、本発明の抗体の可変領域をコードするDNAを用いて遺伝子工学的手法を用いて元のサブクラスとは異なるサブクラスの抗体に変更することができる。更にヒトIgG4重鎖定常部分のEU番号付け（Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242 を参照）における228番目のセリンをプロリンに変異させることにより、IgG4の分子内架橋（S-S結合）による単量体形成を抑制することが、また、同じく235番目ロイシンをグルタミン酸に変異させることにより、抗体依存性細胞傷害(Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)活性を低減させることができる。上記二つの変異を持ったIgG4をIgG4PEと呼ぶ。

【００５６】

上記の事柄を考慮し、本発明者らは細胞傷害活性が低く、かつ、高いヒンジの柔軟性を

持った、アゴニスト抗体に最適な定常領域を作製した。本定常領域は、ヒトIgG3のアッパーヒンジ領域を持ち、ミドルヒンジ以降C末端側の領域はヒトIgG4の配列となっている。この定常領域と抗c-Mplアゴニスト抗体の可変領域を組み合わせることにより、安全性と高活性を兼ね備えたアゴニスト抗体を作製することができる。

【００５７】

２．本発明に係る抗体の製造方法

本発明の抗体は、種々の方法により生産できるが、まずは本発明抗体産生ハイブリドーマを得る必要がある。後述の実施例１に記載するような本発明の抗原を用い、マウス等を免疫し、特にヒト抗体を得る場合にはヒト抗体産生トランスジェニックマウスなどの非ヒト哺乳動物に免疫する。モノクローナル抗体は、定法に従い、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と、自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）を融合することにより得られるハイブリドーマを培養し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって取得することができる。取得した抗体群から更にアゴニスト抗体を選択する必要があるが、アゴニスト抗体の作用対象受容体に対するリガンドの活性測定方法として確立した方法を用いればよく、ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体を選択する場合は、後述の実施例５に示したUT７/TPO細胞増殖アッセイ等のTPO活性測定方法として既に確立された方法を用いて適宜行うことができる。

【００５８】

本発明に係るヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体、特にモノクローナル抗体の製造にあたっては、下記の工程を包含する。すなわち、（1）免疫原として使用する、生体高分子の精製及び/又は抗原タンパク質を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、（2）抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、（3）骨髄腫細胞（ミエローマ）の調製、（4）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、（5）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、（6）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、（7）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、（8）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、（９）モノクローナル抗体遺伝子のクローニングと組換え抗体作製等である。

【００５９】

以下、ヒトc-Mplに対するアゴニストモノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

【００６０】

(1) 抗原

一般にヒトc-mpl抗体を得る場合には、ヒトc-Mplタンパク質の一次構造が公知（Genbank: NP_005364参照）であるので、当業者に周知の方法により、c-Mplのアミノ酸配列からペプチドを化学合成し、これを抗原として使用することができ、またc-Mplの細胞膜貫通領域および細胞内領域を欠損した可溶化c-Mpl組換えタンパク質を抗原として用いることもできる。

【００６１】

或いは、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株等のヒトc-Mpl発現細胞株の抗原としての利用が挙げられる。但し、ヒトc-Mpl発現細胞株としては、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株が知られているが、これらの細胞株のc-Mpl発現量は細胞あたり数千分子と低く、抗原には不向きである。実際、マウス造血系細胞株であるFDCP2にヒトc-Mplを導入した発現株FDCP-hMpl（ FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34参照）をヒト抗体産生マウス（KMマウス™）に免疫した場合、抗体価上昇が不十分であり、hMpl特異的なヒト抗体を得ることができなかった。また、ヒト巨核球系細胞株を抗原として用いる場合、他の膜分子に対する抗体も誘導されるため、c-Mpl特異的な抗体を効率良く誘導するには必ずしも適切でない。従って、目的とするものが単にヒトc-mpl抗体でなくアゴニスト活性を有

する抗体の取得に際し抗原タンパク質を発現する細胞株を免疫に用いる場合には、発現量が高い細胞を選択することが望ましい。特に、マウス細胞株、しかも可能な限りMHC適合した細胞株を宿主に、ヒトc-Mplを導入した高発現株を用いるのが望ましい。例として、後述の実施例１に記載の細胞（発現ベクターとしてヒトc-mpl全長遺伝子が担持されたpEF-MPL635或いはpCMV-MPL635を、宿主としてマウス細胞株L929およびFM3Aを用いたもの）を挙げることができる。

【００６２】

また、野生型のヒトc-mplに代えて、ヒトc-mplの恒常活性型変異体（例えば、508番目TrpがSerに変異しリガンド非依存性に恒常的にアゴニストシグナルを伝達する変異体；Abe Mら、Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506）を同様の方法で強制発現させた細胞株を用いてもよい。このような変異体は野生型とは立体構造が異なることが予想され、そのような恒常活性型変異体に親和性が高い抗体は、強力なアゴニスト活性を示す可能性がある。

【００６３】

また、これら強制発現細胞株は、ヒトｃMPL或いはその細胞外可溶性領域等と適宜組み合わせて抗原として用いることもできる。

【００６４】

(2) 抗体産生細胞の調製工程

上記（１）で得られた抗原と、フロインドの完全若しくは不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては、遺伝子改変によってヒト抗体を産生する能力を有するマウス（ヒト抗体産生マウス）が最適である。

【００６５】

本発明において用いられたヒト抗体産生マウス（例えばKMマウス™）は、内在性マウスイムノグロブリン（Ig）重鎖及びマウスκ軽鎖を欠損しており、かつ、ヒトIg重鎖遺伝子を含む14番染色体断片(SC20)及びヒトIgκ鎖トランスジーン（KCo5）を同時に保持する。このマウスはヒトIg重鎖遺伝子座を持つ系統Aのマウスと、ヒトIgκ鎖トランスジーンを持つ系統Bのマウスとの交配により作製される。系統Aは、内因性Ig重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な14番染色体断片（SC20)を保持するマウス系統（Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol97:722）である。また、系統Bは内在性マウスIg重鎖及びκ軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒトIgκ鎖トランスジーン（KCo5）を保持するマウス系統（Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845）である。従って、KMマウスはヒト抗体を産生する能力を持ち、マウスIg重鎖およびκ鎖を欠損したマウスである。

【００６６】

マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射又は静脈内注射が好ましい。

【００６７】

免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは2週間から4週間間隔で）複数回繰返し行うことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。

【００６８】

ここで用いられる抗体価の測定法としては、フローサイトメトリー法、放射性同位元素免疫定量法（以下、「RIA法」という）、固相酵素免疫定量法（以下、「ELISA法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性、等の観点から、フローサイトメトリー法又はELISA法がより好適である。

【００６９】

本発明における抗体価の測定は、例えばフローサイトメトリー法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、抗原を発現した細胞とヒト抗体を含む検体（例えばマウス血清，ハイブリドーマの培養上清，精製抗体等）と反応させる。さらに二次抗体として蛍光標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後、細胞に結合した二次抗体の量を蛍光によって測定することにより、抗体価を算出する。

【００７０】

(3) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来るが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）ミエローマ株P3X63Ag8U.1（P3-U1）［Yelton, D.E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7（1978）］、P3/NSI/1-Ag4-1（NS-1）［Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519（1976）］、Sp2/O-Ag14（SP-2）［Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270（1978）］、P3X63Ag8.653（653）［Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550（1979）］、P3X63Ag8（X63）［Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497（1975）］などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地［グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清（以下、「FCS」という）を加えたRPMI-1640培地に8-アザグアニンを加えた培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium；以下、「IMDM」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium；以下、「DMEM」という）で継代培養するが、細胞融合の3～4日前に正常培地（例えば、10％ FCSを含むDMEM培地）で継代培養し、融合当日に2×107以上の細胞数を確保しておく。

【００７１】

(4) 細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾臓、リンパ節、骨髄、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

【００７２】

最終免疫後、所定の抗体価が得られたマウスから抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。次いで、脾細胞とミエローマを融合させればよい。この脾細胞と工程（3）で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

【００７３】

脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えば、DMEM）、又はリン酸緩衝生理食塩液（以下、「PBS」という）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が5:1～10:1程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、撹拌しながら1mLの50％（w/v）ポリエチレングリコール（分子量1000～4000）を含む無血清培地を滴下する。その後、10mLの無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（以下「HAT」という）液及びヒトインターロイキン-6（以下、「IL-6」という）を含む正常培地（以下、「HAT培地」という）中に懸濁して培養用プレート（以下、「プレート」という）の各ウェルに分注し、5％炭酸ガス存在下、37℃で2週間程度培養する。途中適宜HAT培地を補う。

【００７４】

（5）ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）欠損株である場合、融合しな

かった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT含有培地中では生存できない。一方、抗体産生細胞どうしの融合細胞、あるいは、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、抗体産生細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT含有培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合細胞であるハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを選択することができる。コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT培地からアミノプテリンを除いた培地（以下、「HT培地」という）への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、フローサイトメトリー法により抗ヒトc-Mpl抗体価を測定する。以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができ、その場合使用する培地組成も変化する。

【００７５】

（6）クローニング工程

前述（2）の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに１個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニュピレーターによって1個づつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便であり、よく用いられる。

【００７６】

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2～4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【００７７】

(7) アゴニスト抗体の選択

得られた抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株の培養上清或いは後記(8)に従って該上清より精製した抗体を、種々のTPO活性測定系にて測定することにより、アゴニスト抗体を選択することができる。スクリーニングとして好適な方法として、哺乳動物細胞にヒトMplを発現させ、細胞増殖アッセイを行う方法が挙げられる。例えばマウス細胞株BaF3にヒトMplを発現させた細胞による増殖アッセイ（Orita et al. Blood. 2005 Jan 15;105(2):562-6.）等も使用し得るが、マウス細胞を用いた場合に、ヒト細胞の反応を反映しているとは限らないことを考慮すると、よりヒト細胞に強い活性を持つ抗体を選抜するにはヒトMplが発現しているヒト細胞を用いる増殖アッセイ方法がより好ましい。ヒト細胞による系として具体的には、後述の実施例５に記載のUT7/TPO細胞を用いた細胞増殖アッセイを挙げることができる。

【００７８】

（8）ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、スピナー培養、あるいはホローファイバーシステム等を用いた培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲルろ過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えばBALB/c）若しくはnu/nuマウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、MAbTrap GIIキット；アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を利用することもできる。かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒトc-Mplに対して高い抗原特異性を有する。

【００７９】

（9）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー（Ouchterlony）法、ELISA法、又はRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法又はRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度［1.4（OD280）＝イムノグロブリン1mg/mL］より算出する方法等により行うことができる。また、ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、配列を決定することでサブクラスを特定することもできる。

【００８０】

（10）モノクローナル抗体をコードする遺伝子のクローニングと組換え型抗体作製

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えば哺乳類細胞細胞株、酵母細胞、昆虫細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することもできる（P.J.Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P.Shepherd and C.Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J.W.Goding., Monoclonal Antibodies:principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。

【００８１】

本発明は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマが保有する抗体の遺伝子配列を含む核酸、特に後述の、本発明のハイブリドーマが産生する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の核酸も包含する。ここで、核酸にはDNA及びRNAが含まれる。

【００８２】

ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子を調製するには、モノクローナル抗体のL鎖V領域、L鎖C領域、H鎖V領域及びH鎖C領域をそれぞれコードするDNAをPCR法等により調製する方法が採用される。プライマーは、抗体遺伝子又はアミノ酸配列から設計したオリゴDNAを、鋳型としてはハイブリドーマから調製したDNAを使用することができる。これらのDNAを１つの適当なベクターに組み込み、これを宿主に導入して発現させるか、あるいはこれらのDNAをそれぞれ適当なベクターに組み込み、共発現させる。

【００８３】

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミド DNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージが挙げられる。

【００８４】

形質転換に使用する宿主としては、抗体の立体構造を正しく構成できることから、真核細胞を挙げることができ、例えば、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。特に動物細胞宿主を用いる場合、ベクターとしては、例えばN5KG1-Val Larkベクター(IDEC pharmaceuticals: US patent 6001358)を用いることができる。本ベクターは、組換え抗体を動物細胞に発現させる目的で使用される発現ベクターで、２つのCMVプロモーター／エンハンサーを持ち、それぞれの 下流に重鎖および軽鎖可変領域のクローニングサイトを持つ。さらにその下流には、ヒトγ１鎖定常領域とヒトκ鎖定常領域をコードする遺伝子配列をあらかじめ持っている。本ベクターの可変領域クローニングサイトに任意の重鎖および軽鎖可変領域を、読み枠（フレーム）をあわせて組み込むことにより、軽鎖可変領域がヒトκ鎖定常領域と、重鎖可変領域がヒトγ1定常領域と連結された抗体を発現させることができる。本ベクターを導入された動物細胞は培養液中に抗体（ヒトIgG1）を産生する。また、異なる重鎖定常領域遺伝子を含むベクターも使用することができる。例えばN5KG4PEベクター(IDEC pharmaceuticals社製)は定常領域遺伝子として、ヒトγ４に、上述した二つの変異（Ser228Pro, Leu235Glu）が入った配列を持っている。

N5KG4PEベクターに任意の重鎖および軽鎖可変領域遺伝子配列を組み込むことで、任意の可変領域を持つIgG4PEを発現させることができる。さらに、重鎖または軽鎖遺伝子に改変を加えることで、様々な定常領域を持った抗体を作製することが可能である。

【００８５】

もちろん、本発明に用いる哺乳動物細胞用発現ベクターは上記のものに限定されるものではない。例えば発現を制御する塩基配列として前述CMVプロモーター/エンハンサーを利用した他の発現ベクターを用いてもよいし、これとは異なった公知のプロモーター/エンハンサー（１若しくは複数）を発現制御配列として使ってもよい。プロモーターとしては、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日公開のUK2211504）、アデノウイルス（例えばアデノウイルス２）、ウシ乳頭腫ウイルス、鳥の肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、ヘテロローガスな哺乳動物プロモーター（例えばアクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱衝撃プロモーター）を挙げることができる。プロモーターに作用し転写を増大させるエンハンサーとしては、公知の哺乳動物遺伝子由来のエンハンサー（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトプロテイン、およびインシュリン）、および、真核細胞ウイルス由来のエンハンサー（複製起点の後期側のＳＶ40エンハンサー（bp100-270）、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサー）を用いることができる。

【００８６】

また、発現ベクターには、転写の終止およびmRNAの安定化に必要な配列を含むことができる。このような配列は普通、真核生物のまたはウイルスのDNAまたはcDNAの５'および時には３'非翻訳領域から取得することができる。

【００８７】

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

【００８８】

本発明において、目的とする抗体は、形質転換体を培養し、その培養上清から採取することにより得ることができる。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

【００８９】

培養後、細胞外に生産された抗体の精製は、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により細胞を除去して行う。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

【００９０】

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（Wright, G., et al. （1991） Bio/Technology 9, 830-834）。

【００９１】

本発明に係るヒトMplに対するアゴニスト抗体の製法として、好ましい方法は、前述の[課題を解決するための手段]の４．にて例示した遺伝子組換え技術による方法であるが、これに限定されるものではない。

【００９２】

３．本発明に係るDNA

本発明は、上で述べたように、

(1) ヒトMplに対するアゴニスト抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列であって以下の(a)～(d)から選択されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA:

(a) 配列番号２で示されるアミノ酸配列;

(b) 配列番号４で示されるアミノ酸配列;

(c) 配列番号６で示されるアミノ酸配列;

(d) 配列番号８で示されるアミノ酸配列;

及び、

【００９３】

(2) ヒトMplに対するアゴニスト抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列であって以下の(a)～(h)から選択されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA:

(a) 配列番号３で示されるアミノ酸配列;

(b) 配列番号５で示されるアミノ酸配列;

(c) 配列番号７で示されるアミノ酸配列;

(d) 配列番号９で示されるアミノ酸配列;

(e) 配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;

(f) 配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;

(g) 配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;

(h) 配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列;

を提供するものであり、上記２．の本発明に係るヒトMplに対するアゴニスト抗体の製法、より具体的には、遺伝子組換え技術を用いた抗体の製造において、用いることができる。

【００９４】

これら可変領域のアミノ酸配列(a)～(d)をコードするDNAは、前述のヒトMplに対するアゴニスト抗体産生ハイブリドーマ取得方法によって得られたハイブリドーマ株より、後述実施例７の通り、定法によりmRNAを抽出し既知である抗体定常領域のアミノ酸配列に基づくプライマーを用いて5’RACE法により取得したものであり、その可変領域をコードする各DNAを含むプラスミドは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-1　つくばセンター中央第６）に2006年3月14日付にてブダペスト条約に基づく国際寄託がされている。

【００９５】

【表１】

表１

配列番号 (プラスミド名称)	受託番号	受託日
2 (Anti-hMpl 7-10_HV/pCR4)	FERM BP-10559	2006年3月14日
4 (Anti-hMpl 4-49_HV/pCR4)	FERM BP-10553	2006年3月14日
6 (Anti-hMpl 6-4-50_HV/pCR4)	FERM BP-10555	2006年3月14日
8 (Anti-hMpl 6-5-2_HV/pCR4)	FERM BP-10557	2006年3月14日
3 (Anti-hMpl 7-10_LV/pCR4)	FERM BP-10560	2006年3月14日
5 (Anti-hMpl 4-49_LV/pCR4)	FERM BP-10554	2006年3月14日
7 (Anti-hMpl 6-4-50_LV/pCR4)	FERM BP-10556	2006年3月14日
9 (Anti-hMpl 6-5-2_LV/pCR4)	FERM BP-10558	2006年3月14日

【００９６】

本発明のアゴニスト抗体を構成する軽鎖の可変領域は、その特定例として、配列番号３、５、７又は９に示されるアミノ酸配列を含むが、これらのアミノ酸配列のフレームワーク領域に１若しくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、付加又は挿入を含んでもよいし、或いはこれらのアミノ酸配列のフレームワーク領域の配列と少なくとも85％、86％、87％、88％又は89％、好ましくは少なくとも90％、92％、93％又は94％、より好ましくは少なくとも95％、96％、97％、98％又は99％の同一性を有する配列を含んでいてもよい。フレームワーク領域は、可変領域において３つのCDR（相補性決定部位；complementarity-determining region）、すなわち配列番号３、５又は７に示されるアミノ酸配列においては、RASQGISS(A又はT)LA（アミノ酸位置24-34）、DASSLES（アミノ酸位置50-56）、及びQQFNSYP(L又はY又はW)T（アミノ酸位置89-97）、を除く領域を指し、配列番号９に示されるアミノ酸領域においては、RASQSVSSSYLA(アミノ酸位置24-35)、DASSRAT（アミノ酸配列51-57）、及びQQYGSSPIT（アミノ酸位置90-98）、を除く領域を指す。後述の実施例１７で実証するとおり、フレームワーク領域内にアミノ酸変異が存在しても、本発明の変異型抗体はいずれも、非変異型抗体の場合とほぼ同等のアゴニスト活性、すなわち、FM3A-hMpl細胞などのFM3A-hMpl細胞のヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力及び/又はUT-7/TPO細胞の増殖能を有することができる。

【００９７】

そのような変異の例は、保存的アミノ酸間での置換である。保存的アミノ酸は、電荷、構造、極性などの性質が類似したアミノ酸群であり、例えば塩基性アミノ酸(Arg、His、Lys)、酸性アミノ酸(Glu、Asp)、非極性アミノ酸(Ala、Leu、Ile、Val、Gly、Pro)、極性アミノ酸(Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln)、芳香族アミノ酸(Phe、Tyr、Trp）に分類することができる。

【００９８】

また、配列同一性は、２つ又はそれ以上の配列を、ギャップを導入して又はギャップを導入しないで整列比較したときのアミノ酸（又はヌクレオチド）配列間の一致率を表わし、一般に全アミノ酸（又はヌクレオチド）数に対する同一アミノ酸（又はヌクレオチド）数のパーセンテージである。配列同一性は、必要に応じてNCBI(米国)などのデータバンクにアクセスし、配列検索用のBLAST、FASTAなどの公知のアルゴリズムを利用して決定することができる。

【００９９】
変異の導入は、変異を含まないアミノ酸配列をコードするDNAに対して、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法（変異を含むプライマーを使用する）などを適用することによって実施することができる。変異導入法は、例えばSambrookら, Molecular Cloning A Laboratory Mannual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)などに記載されている。
【０１００】
本発明の上記DNAはさらに、可変領域に加え、それぞれ重鎖或いは軽鎖の定常領域をコードする塩基配列を含むものであってもよい。
また、本発明に係る抗体の製造方法の項で述べた重鎖定常領域の改変は、寄託したDNA及び公知のヒト抗体定常領域の配列に基づき、周知の遺伝子工学的改変手法により得ることができる。
【０１０１】
４．ヒトｃ-Mplに対するアゴニスト抗体の医薬用途及び医薬組成物
本発明に係るヒトｃ-Mplに対するアゴニスト抗体は、c-MPL受容体に結合しそれを活性化する能力、および／または（インビボおよびインビトロの両方で）血小板の産生を刺激する能力（「血小板生成活性」）および血小板前駆体の産生を刺激する能力（「巨核球生成活性」）を有する。
【０１０２】
また、ヒトc-Mpl受容体は、巨核球のみならず造血幹細胞においても発現しているとされている。正常動物において、PEG-rHuMGDF投与により骨髄中の赤芽球系や顆粒球／マクロファージ系の前駆細胞が増加したとの報告もある（Stem Cell,14:651-660,1996）。しかし、ヒト臍帯血移植マウスにおいては、PEG-rHuMGDFの投与によりマウスの巨核球系以外の前駆細胞の増殖は見られたが、ヒトの前駆細胞の増殖は認められなかった。一方、ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体においては骨髄中のヒト赤血球および顆粒球／マクロファージ系の前駆細胞の数が有意に高かった（実施例14）。このことは、ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体がヒト細胞に選択的にシグナルを入れ、巨核球系のみならず、他系列の細胞の生着も促進できる可能性を示唆している。
【０１０３】
本発明に係るヒトｃ-Mplに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物により治療される状態は、一般には、存在する巨核球／血小板の欠乏または将来において予期または予想される巨核球／血小板の欠乏（例えば、計画されている手術または血小板供与によるもの）を伴う状態である。そのような状態は、インビボにおける活性Mplリガンドの（一時的または永久的な）欠乏により生じうる。したがって本発明の組成物は、血小板欠乏状態即ち血小板減少症の治療を要する患者において血小板減少症を予防的または治療的な治療するために利用可能である。さらに、汎血球減少を長期間に渡って伴う造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植）後の血球回復のための治療を要する患者において、汎血球減少症を予防的または治療的な治療をするためにも利用可能である。
【０１０４】
血小板減少症（血小板欠乏症）は、化学療法および種々の薬物での他の療法、放射線療法、手術、不慮の出血、および他の具体的な病態を含む種々の理由により生じうる。血小板減少症を伴い本発明に従い治療されうる典型的な具体的な病態としては以下のものが挙げられる：無形成貧血；特発性または免疫血小板減少症（ITP）、例えば乳癌に伴う特発性血小板減少性紫斑病；HIVに伴うITPおよびHIVに関連した血栓性血小板減少性紫斑病；血小板減少症を引き起こす転移性腫瘍；全身性エリテマトーデス、例えば新生児ループス症候群脾腫；ファンコーニ症候群；ビタミンB12欠乏症；葉酸欠乏症；メイ-ヘグリンの異常；ウィスコット-アルドリッチ症候群；慢性肝疾患；血小板減少症に関連した骨髄形成異常症候群；発作性夜間ヘモグロビン尿症；C7E3 Fab（Abciximab）療法後の急性深部血小板減少症；同種免疫血小板減少症、例えば母性同種免疫血小板減少症；抗リン脂質抗体および血栓症に関連した血小板減少症；自己免疫血小板減少症；薬物により誘発された免

疫血小板減少症、例えばカルボプラチンにより誘発された血小板減少症、ヘパリンにより誘発された血小板減少症；胎児血小板減少症；妊娠血小板減少症；ヒュージー症候群；ルポイド血小板減少症；不慮の及び／又は大量の失血；骨髄増殖性異常症；悪性疾患を有する患者における血小板減少症；血栓性血小板減少紫斑病、例えば癌患者において血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒症性症候群として現れる血栓性細小血管症；自己免疫性溶血性貧血；潜在性空腸憩室穿孔；真正赤血球系無形成症；自己免疫血小板減少症；流行性（epidemica）腎障害；ラファンピシンに関連した急性腎不全；Paris-Trousseau血小板減少症；新生児同種免疫血小板減少症；発作性夜間ヘモグロビン尿症；胃癌における血液学的変化；小児における溶血性尿毒症性症候群；A型関連ウイルスを含むウイルス感染に関連した血液学的徴候およびCMVに関連した血小板減少症。また、ある種のエイズ治療は血小板減少症を引き起こす（例えば、AZT）。また、ある種の創傷治癒障害は、血小板数の増加が有益であろう。なお上記疾患においては、血小板減少のみならず、その他の血球減少を伴う疾患も存在する。

【０１０５】

予想される血小板の欠乏（例えば、将来の手術によるもの）に対して、血小板が必要となる前に数日から数時間にわたり有効成分としての本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。緊急の状況（例えば、不慮の及び大量の失血）では、血液または精製血小板と共に本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。あるいは、汎血球の欠乏（例えば、臍帯血移植によるもの）に対しても、有効成分としての本発明のアゴニスト抗体を投与することが可能であろう。

【０１０６】

特に好ましい治療対象としては、(1)特発性血小板減少性紫斑病もしくは肝疾患にともなって起こる血小板減少症、(2)癌化学療法、再生不良性貧血、骨髄異形性症候群（MDS）、骨髄移植もしくは臍帯血移植にともなって起こる血小板減少症および／または汎血球減少症を挙げることができる。

【０１０７】

本発明のヒトｃ-MPLに対するアゴニスト抗体はまた、血小板および／または巨核球および関連細胞の生存能または保存寿命を維持するのに有用で有り得る。したがって、そのような細胞を含有する組成物中に有効量を含有させるのが有用であろう。

【０１０８】

本発明にかかるヒトｃ-MPLに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物は、注射用または経口、鼻、経皮または他の投与形態のためのものであってもよい。それらには、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、鞘内、眼内、延髄後方、肺内（例えば、エアゾール化薬）または皮下注射（長期にわたる放出のためのデポ投与を含む）、舌下、肛門、膣または外科的移植、例えば脾漿膜下、脳または角膜内の埋め込みによる投与が含まれる。該治療は、単回投与または一定期間にわたる複数回の投与よりなるものであってもよい。一般には、本発明にかかるヒトｃ-MPLに対するアゴニスト抗体の有効量と医薬上許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、佐剤および／または担体とを含む医薬組成物が本発明に含まれる。そのような組成物は、種々のバッファー含有物（例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度の希釈剤；添加物、例えば界面活性剤および可溶化剤（例えば、Tween 80、Polysorbate 80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、Thimersol、ベンジルアルコール）および増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの重合体化合物の粒子状製剤内またはリポソーム内に該物質が封入されたものを含む。所望により、医薬ビヒクル、賦形剤または媒体として働く更に他の医薬上許容される液体、半固体または固体希釈剤を含んでいてもよい。それらには、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート、ステアリン酸マグネシウム、メチル-およびプロピルヒドロキシベンゾアート、デンプン、スクロース、デキストロース、アラビアゴム、リン酸カルシウム、鉱油、カカオ脂およびテオブロマの油が含まれるが、これらに限定されるものではない。該組成物は、液体形態または乾燥粉末（例えば、凍結乾燥形態）として製造すること

ができる。移植可能な徐放製剤、および経皮製剤も意図される。

【０１０９】

上記の状態の治療方法にかかわる投与計画は、薬物の作用を改変する種々の要因（例えば、患者の年齢、状態、体重、性別および食事、いずれかの感染の重症度、投与時間ならびに他の臨床的要因）を考慮して担当医師により決定されるであろう。一般には、該用量は、1日当たり本発明抗体100μg～1mg/kg体重、好ましくは10～100μg/kg、より好ましくは1～10μg/kgであり、これらを、1日量で、あるいはより長い又はより短い間隔で（例えば、1日おき、1週間に2回、毎週、または毎日2回または3回）同等量で投与する。

【０１１０】

また、本発明にかかるヒトｃ-MPLに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物は、単独で又は他のサイトカイン、可溶性Mp1受容体、造血因子、インターロイキン、増殖因子と組合せて、血小板の欠乏および他の症状により特徴づけられる病態の治療において使用することができる。造血の一般的な刺激因子（例えば、IL-3またはGM-CSF）と組合せて、いくつかの形態の血小板減少症を治療するのに有用であると予想される。また、他の巨核球刺激因子、すなわちmeg-CSF、幹細胞因子（SCF）、白血病阻害因子（LIF）、オンコスタチンM（OSM）または巨核球刺激活性を有する他の分子を、Mp1リガンドと共に使用することができる。そのような共投与のための追加的な代表的なサイトカインまたは造血因子には、IL-1アルファ、IL-1ベータ、IL-2、IL-3、IL-4、IL5、IL-6、IL-11、コロニー刺激因子-1（CSF-1）、M-CSF、SCF、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、EPO、インターフェロン-アルファ（IFN-アルファ）、コンセンサスインターフェロン、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、トロンボポエチン（TPO）、アンジオポエチン、例えばAng-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4、Ang-Y、ヒトアンジオポエチン様ポリペプチド、血管内皮増殖因子（VEGF）、アンジオゲニン、骨形成因子（bone morphogenic protein）-1、骨形成因子-2、骨形成因子-3、骨形成因子-4、骨形成因子-5、骨形成因子-6、骨形成因子-7、骨形成因子-8、骨形成因子-9、骨形成因子-10、骨形成因子-11、骨形成因子-12、骨形成因子-13、骨形成因子-14、骨形成因子-15、骨形成因子受容体IA、骨形成因子受容体IB、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子α、サイトカイン誘導性好中球走化因子1、サイトカイン誘導性好中球走化因子2α、サイトカイン誘導性好中球走化因子2β、β内皮細胞増殖因子、エンドセリン1、上皮増殖因子、上皮由来好中球誘引物質、繊維芽細胞増殖因子4、繊維芽細胞増殖因子5、繊維芽細胞増殖因子6、繊維芽細胞増殖因子7、繊維芽細胞増殖因子8、繊維芽細胞増殖因子8b、繊維芽細胞増殖因子8c、繊維芽細胞増殖因子9、繊維芽細胞増殖因子10、酸性繊維芽細胞増殖因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α2、成長関連タンパク質（growth related protein）、成長関連タンパク質α、成長関連タンパク質β、成長関連タンパク質γ、ヘパリン結合性上皮増殖因子、肝細胞増殖因子、肝細胞増殖因子受容体、インスリン様増殖因子I、インスリン様増殖因子受容体、インスリン様増殖因子II,インスリン様増殖因子結合タンパク質、角質細胞増殖因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子受容体α、神経成長因子、神経成長因子受容体、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、胎盤増殖因子、胎盤増殖因子2、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、血小板由来増殖因子A鎖、血小板由来増殖因子AA、血小板由来増殖因子AB、血小板由来増殖因子B鎖、血小板由来増殖因子BB、血小板由来増殖因子受容体α、血小板由来増殖因子受容体β、プレB細胞増殖刺激因子、幹細胞因子受容体、TNF（TFN0、TNF1、TNF2を含む）、トランスフォーミング増殖因子α、トランスフォーミング増殖因子β、トランスフォーミング増殖因子β1、トランスフォーミング増殖因子β1.2、トランスフォーミング増殖因子β2、トランスフォーミング増殖因子β3、トランスフォーミング増殖因子β5、潜在（latent）トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質I、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質II、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質III、腫瘍壊死因子受容体I型、腫瘍壊死因子受容体II型、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター受容体、血管内皮増殖因子、ならびにそれらのキメラタンパク質が含まれ

る。

【０１１１】

したがって、本発明にかかるヒトｃ-Mplに対するアゴニスト抗体を有効成分とする医薬組成物の投与（成熟巨核球の数を増加させるためのもの）は、血小板の産生を刺激する特に有効な手段であると予想される。さらに造血幹細胞の産生を刺激することにおいても有用な手段であると予想される。前記で列挙した用量は、該治療用組成物中のそのような追加的な成分を補償するように調節されるであろう。治療された患者の経過は、通常の方法によりモニターすることができる。

【０１１２】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【０１１３】

[実施例１] 抗原の調製

1-1 ヒトc-Mpl発現細胞の作製

抗原タンパク質を発現する細胞株を免疫に用いる場合、一般的に発現量が高いほど抗体作製には有利である。ヒトc-Mpl発現細胞株としては、各種ヒト巨核球系細胞株や強制発現株が知られているが、これらの細胞株のc-Mpl発現量は細胞あたり数千分子と低く、抗原には不向きである。実際、マウス造血系細胞株であるFDCP2にヒトc-Mplを導入した発現株FDCP-hMpl（FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34.参照）をヒト抗体産生マウス（KMマウス™）に免疫した場合、抗体価上昇が不十分であり、hMpl特異的なヒト抗体を得ることができなかった。また、ヒト巨核球系細胞株を抗原として用いる場合、他の膜分子に対する抗体も誘導されるため、c-Mpl特異的な抗体を効率良く誘導するためには、マウス細胞株、しかも可能な限りMHC適合した細胞株を宿主に、ヒトc-Mplを導入した高発現株を用いるのが望ましい。そこで、ヒトc-Mpl（hMpl）高発現株を作製するために、hMpl発現ベクターを以下の通り作製し、かつ2種類のマウス細胞株(L929およびFM3A)へ導入を行った。

【０１１４】

更に、hMplにはリガンド非依存性に恒常的にアゴニストシグナルを伝達する変異型受容体が報告されている（508番目TrpがSerに変換している変異体、Abe Mら、Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506）が、このような変異体は野生型とは立体構造が異なることが予想される。このような恒常活性型変異体に親和性が高い抗体は、強力なアゴニスト活性を示す可能性がある。そこで、恒常活性型変異体(以下hMpl-Ser)の発現ベクターも作製し、発現細胞を作製して免疫に用いた。

【０１１５】

1) 抗ヒトc-Mpl（hMpl）発現ベクターの調製

hMplの全長cDNAを保持するプラスミドDNAであるhumpl-Pas12(Bartley TDら、 Cell 1994 Jul 1;77(7):1117-1124.或はMorita Hら、FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-234.)のDNAを鋳型としてhMplのコーディング領域全域を増幅するPCR反応を実施した。プライマーとして、末端に連結のための制限酵素部位（5’末側EcoRI、3’末側XbaI）を付加するようにデザインした、Mpl_F1及びMpl_R2を用いて、KOD-Plus- DNAポリメラーゼ（東洋紡績（株）製、日本）によるPCRで増幅した。以下、実施例中のPCRの反応温度調節は、ジーンアンプPCRシステム9700（（株）パーキンエルマー・ジャパン社製）を使用した。反応温度条件としては、94℃の初期温度で5分間の加熱後、98℃/10秒間と68℃/3分間のサイクルを30回反復し、最後に72℃/7分間加熱した。増幅したPCR断片は、エタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、メンブランを用いるDNA精製キットであるQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）にて精製した。精製したDNA断片をpCR4 Blunt- TOPO ベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列決定のためのプライマーとして、M13-20FW及びM13RVを用いた。挿入部分のDNA塩基配列解析を行い

、hMplの配列（GenBank ACCESSION :M90102）と相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドDNAを選択した。次に、hMplの配列を含むプラスミドDNAを精製した後、制限酵素EcoRIとXbaIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約2kb弱のDNAを回収し精製した。他方、ヒトEFプロモーターとブラストサイジン（Bsd）選択マーカーを有する発現ベクターであるpEF6/Myc-His（インビトロジェン（株）社製）、及び、CMVプロモーターとネオマイシン（Neo）選択マーカーを有するpEGEP-N1ベクター（ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）についても、同様に制限酵素EcoRI、とXbaIでの消化処理を行った後、脱リン酸化のためにAlkaline Phosphatase (E. coli C75)（タカラバイオ（株）、日本）で処理した後に、アガロースゲル電気泳動とDNA精製キットでDNAを回収した。精製したhMplの全領域DNA断片を、それぞれの発現ベクターDNAにT4 DNA ligase を用いてライゲーションして、大腸菌DH10Bへ導入し、それぞれ形質転換体を得た。インサートDNAを含む形質転換体のプラスミドDNAについてDNA塩基配列を解析して、hMplの全長cDNAが挿入されたpEF-MPL635及びpCMV-MPL635を取得した。

【０１１６】

Mpl_F1：5’-AGAGAGAGAG GAATTCGCCA CCATGCCCTC CTGGGCCCTC TT-3’（配列番号12）
Mpl_R2：5’- AGAGAGAGAG CGGCCGCTCA AGGCTGCTGC CAATAGCTTA GTG -3’（配列番号13）
M13-20FW: 5’-GTAAAACGACGGCCAGTG-3’（配列番号14）
M13RV：5’-CAGGAAACAGCTATGAC-3’（配列番号15）

【０１１７】

2) 恒常活性型ヒトc-Mpl（hMpl-Ser）発現ベクターの調製

TPO非依存性に細胞内のシグナル活性化が報告されているhMpl変異体（508番目TrpがSerに変換している変異体、Abe Mら、Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506）の発現ベクターを作製した。508番目のアミノ酸残基をコードするコドンを変更（TGG→TCG）するために、pEF-MPL635のDNAを鋳型として、GeneEditor™ in vitro Site-Directed Mutagenesis System（プロメガ社）を用いた部位特異的変異導入法を実施した。変異導入用オリゴヌクレオチド（5’末端リン酸化済み）としては、Mut_MplSer508を用いた。目的の変異導入用オリゴヌクレオチドと上記キット付属のSelection Oligonucleotideを鋳型DNAとアニーリングさせて変異導入鎖を合成した後、GeneEditor™ Antibiotic Selection Mix存在下では変異体のみが増殖することを利用して変異体を選択した。より具体的には、dsDNAテンプレートをアルカリ条件下（0.2M NaOH、0.2 mMEDTA（最終濃度））室温で5分間インキュベートした後、２M酢酸アンモニウム（pH4.6）を10分の１容量加えて中和してからエタノール沈殿により回収した。アルカリ変性処理した鋳型DNAに、変異導入用オリゴヌクレオチドと新しい抗生物質耐性獲得用Selection Oligonucleotide（5’末端リン酸化）、及び、キット添付のアニーリングバッファーを加えた後、75℃で5分間保温し、37℃にゆっくり下げることによりアニーリングを行なった。次に、変異鎖の合成と連結のために、キット付属のSynthesis 10×buffer、T4 DNA Polymerase、及びT4 DNA ligaseを加えて、37℃で90分反応を行なった。GeneEditor™ Antibiotic Selection Mix存在下でコンピテントセルBMH 71-18 mutSに形質転換して培養した形質転換体大腸菌よりプラスミドDNAを調製し、更にそのDNAによりコンピテントセルJM109を形質転換後、GeneEditor™ Antibiotic Selection Mixを含むLBプレートに播種した。プレートに生じた形質転換体を培養して、プラスミドDNAのDNA塩基配列を解析して、508番目のアミノ酸が変換（TrpからSer）したhMplを発現するpEF-MPL635-Serベクターを取得した。

Mut_MplSer508：5’-CTGCTGCTGC TGAGGTCGCA GTTTCCTGCA CACTAC-3’（配列番号16）

【０１１８】

3) 全長ヒトc-Mpl発現L929細胞の作製

作製したpEF-MPL635ベクター（1μg）を、Lipofectamine試薬（Invitrogenより購入）および Lipofectamine PLUS（Invitrogenより購入）試薬と混合し、さらに無血清Dulbecco’s Modified Eagle Medium（DMEM）培地と混合した。混合液を1.5x10^{5}cells/well で6-well plateに培養したL929細胞に添加し、３時間培養することで細胞にDNAを導入した。1

0%ウシ胎児血清（FBS）添加DMEM培地にて一晩培養し、翌日より、培地に10μg/mL Blasticidin（Invitrogenより購入）を加えて薬剤耐性細胞を選抜した。その後、抗c-Mpl抗体を用いたFluorescence Activated Cell Sorting（FACS）法にてc-Mpl発現細胞を単離し、全長ヒトc-Mpl発現L929細胞株（以下、L929-hMpl）を樹立した。FACSはFACS-Vantage（Becton Dickinson社製）によって行った。選抜後は5μg/mL Blasticidin, 10%FBS添加DMEM培地にて培養、維持した。

【０１１９】

4) 全長ヒトc-Mpl発現FM3A細胞の作製

上記 3)と同様の方法でpEF-MPL635ベクターをFM3A細胞に導入し、全長ヒトc-Mpl発現FM3A細胞株（以下、FM3A-hMpl）を樹立した。5μg/mL Blasticidin, 10%FBS添加 Roswell Park Memorial Institute（RPMI）培地にて培養、維持した。

【０１２０】

5) 恒常活性型ヒトMpl発現FM3A細胞作製

上記、pEF-MPL635-Serベクターを、3)と同様の方法で、FM3A細胞に導入し、hMpl-Ser発現FM3A細胞株（以下、FM3A-hMpl-Ser）を樹立した。5μg/mL Blasticidin, 10%FBS添加RPMI培地にて培養、維持した。

1-2 可溶化ヒトc-Mpl組換えタンパク質の作製

ヒトc-Mplの細胞膜貫通領域および細胞内領域を欠失させた、下記配列の可溶化型ヒトc-MplをコードするDNAを発現ベクターpEAK8（EdgeBioSystems社製）に結合し、トランスフェクタム試薬（Promega社より入手可能）にてHek293細胞に導入した。安定発現株を選択後、その培養上清を抗Mpl抗体カラムにて精製し、可溶化型ヒトc-Mpl組換えタンパク質（以下soluble Mpl-x、sMpl-xと略記）を調製した。

【０１２１】

NH_2-MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFWDEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGSWSLPVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKSRNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLEPPLGARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW-COOH（配列番号17）

【０１２２】

[実施例２] モノクローナル抗体の作製

本発明の抗体は、遺伝子改変によってヒト抗体を産生する能力を持つヒト抗体産生マウス（KMマウス™）を免疫し、モノクローナル抗体を作製することで得られた。KMマウスは、内在性マウスイムノグロブリン（Ig）重鎖及びマウスκ軽鎖を欠損しており、かつ、ヒトIg重鎖遺伝子を含む14番染色体断片(SC20)及びヒトIgκ鎖トランスジーン（KCo5）を同時に保持する。即ち、KMマウスはヒト抗体を産生する能力を持ち、マウスIg重鎖およびκ鎖を欠損したマウスである。このマウスはヒトIg重鎖遺伝子座を持つ系統Aのマウスと、ヒトIgκ鎖トランスジーンを持つ系統Bのマウスとの交配により作製される。系統Aは、内因性Ig重鎖及びκ軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な14番染色体断片 (SC20)を保持するマウス系統（Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol97:722参照）である。また、系統Bは内在性マウスIg重鎖及びκ軽鎖欠損の両者についてホモ接合体であり、ヒトIgκ鎖トランスジーン（KCo5）を保持するマウス系統（Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845参照）である。

【０１２３】

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、公知の方法によって行った（単クローン抗体実験操作入門 安東民衛ら著作、講談社（東京、日本）発行 1991参照）。

1) 免疫

免疫原としてのヒトc-Mplは、実施例１で作製したL929-hMpl細胞、FM3A-hMpl細胞、恒常活性型c-Mpl発現FM3A-hMpl-Ser細胞、sMpl-x組換えタンパク質を用いた。被免疫動物は

、実施例2で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウス使用し、下記の免疫方法で行った。

【０１２４】

免疫方法１：　９週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例1で作製したL929-hMpl細胞（5×10^6細胞）をRibiアジュバンドと混合し、腹腔内に初回免疫した。初回免疫以降、一週間ごとに、同細胞（2×10^6細胞）を、インターロイキン６（IL-6）（５μg）と同時に、尾静脈経由で７回免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得3日前に同細胞を尾静脈経由で最終免疫した。

【０１２５】

免疫方法２：　９週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例1で作製したFM3A-hMpl-Ser細胞（5×10^6細胞）に紫外線照射し、Ribiアジュバンドを加え腹腔内に初回免疫した。初回免疫から以降、同細胞（5×10^6細胞）を腹腔内投与で、一週間ごとに７回免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得3日前に、実施例1で作製したFM3A-hMpl細胞（2×10^6細胞）をIL-6（5μg）を加えて、尾静脈経由で最終免疫した。

【０１２６】

免疫方法３：　９週齢のヒト抗体産生マウスに、実施例1で作製したsMpl-x組換えタンパク質（10μg）を、完全フロイントアジュバンド（CFA）と混合して皮下投与で初回免疫した。２回目から５回目の免疫は、一週間に一度、sMpl-x組換えタンパク質（５μg）を不完全フロイントアジュバンド（IFA）と混合して皮下投与で免疫した。６回目から８回目の免疫では、L929-hMpl細胞（5×10^6細胞）を腹腔内に免疫した。さらに、脾臓及びリンパ節の取得3日前に、sMpl-x組換えタンパク質（５μg）およびIL-6（５μg）を、尾静脈経由で最終免疫した。

【０１２７】

2) ハイブリドーマ作製

最終免疫の３日後にマウスから脾臓及び/又はリンパ節を外科的に取得し、350mg/ml 炭酸水素ナトリウム、50単位/ml ペニシリン、50μg/ml ストレプトマイシンを含む無血清DMEM培地 10ml中に入れ、メッシュ（セルストレイナー：ファルコン社製）上でスパーテルを用いてつぶした。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して細胞を沈澱させた後、この細胞を無血清DMEM培地で2回洗浄してから、無血清DMEM培地に懸濁して細胞数を測定した。一方、10% FCSを含むDMEM培地にて、37℃、5%炭酸ガス存在下で細胞濃度が1×10^8細胞/mlを越えないように培養したミエローマ細胞 SP2/0（ATCC No.CRL-1581）を同様に無血清DMEM培地で洗浄し、無血清DMEM培地に懸濁して細胞数を測定した。回収した細胞の懸濁液とマウスミエローマ懸濁液とを細胞数5:1で混合し、遠心後、上清を完全に除去した。このペレットに、融合剤として50%(w/v) ポリエチレングリコール1500（ベーリンガーマンハイム社製）1mlを、ピペットの先で撹拌しながらゆっくり添加した後、予め37℃に加温しておいた無血清DMEM培地1mlを2回に分けてゆっくり添加し、さらに7mlの無血清DMEM培地を添加した。遠心後、上清を除去して得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清（Fetal Calf Serum、FCS）とヒポキサンチン(H)、アミノプテリン(A)、チミジン(T)（以下「HAT」という。：シグマ社製）を含有するDMEM培地中で培養することによって行った。さらに、10% FCSとHT（シグマ社製）とを含有するDMEM培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96穴マイクロタイタープレート（ベクトンディッキンソン社製）中で行った。抗ヒトc-Mplヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択（スクリーニング）及び各々のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、実施例４に記載のフローサイトメトリー、あるいは実施例５に記載のUT7/TPO細胞を用いた細胞増殖アッセイによって行った。アゴニスト抗体の活性評価系として、BaF3等のマウス細胞株にヒトMplを発現させ、細胞増殖アッセイを行うことができる（Orita et al. Blood. 2005 Jan 15;105(2):562-6.）が、そのような細胞の反応が、ヒト細胞の反応を反映しているとは限らない。UT7/TPOはヒト由来細胞株であるため、これをスクリーニングに用いることで、よりヒト細胞に強い活性を持つ抗体を選抜し易いと

考えられる。

【０１２８】

スクリーニングの結果、抗ヒトMplアゴニスト抗体産生ハイブリドーマとして、免疫方法１によるハイブリドーマ7-10、免疫方法２によるハイブリドーマ4-49、免疫方法３による ハイブリドーマ6-4-50，6-5-2の４クローンが選抜された。また、非アゴニスト抗体産生ハイブリドーマとして2-35（免疫方法１により得たもの）をコントロールとして選抜した。

【０１２９】

[実施例３] ハイブリドーマ培養上清からの精製抗体調製

ハイブリドーマの培養上清からの抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体の精製は以下の方法で行った。抗体を含む培養上清をrmp Protein A（アマシャムファルマシアバイオテク社製）及び0.8×40cm カラム（バイオラッド社製）を用い、吸着緩衝液としてPBS、溶出緩衝液として0.02M グリシン緩衝液（pH 3）を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1M Tris (pH 9.0)を添加してpH7.2付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜（10000カット、Spectrum Laboratories社製）を用いてPBSに置換し、孔径0.22μm のメンブランフィルターMILLEX-GV（ミリポア社製）でろ過滅菌し、精製抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体を得た。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/ml を1.4 OD として算出した。

【０１３０】

抗ヒトc-Mplモノクローナル抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。

まず、抗体産生ハイブリドーマを10ng/ml Recombinant Human IL-6(R&D Systems社製)、10% Low IgG Fetal Bovine Serum（HyClone社製）含有eRDF培地（極東製薬社製）に馴化した。この馴化したハイブリドーマを凍結保存した。次に、その一部を、ウシインシュリン（5μg/ml、ギブコビーアールエル社製）、ヒトトランスフェリン（5μg/ml、ギブコビーアールエル社製）、エタノールアミン（0.01mM、シグマ社製）、亜セレン酸ナトリウム（$2.5x10^{-5}$mM、シグマ社製）、10ng/ml Recombinant Human IL-6(R&D Systems社製)、1% Low IgG Fetal Bovine Serum（HyClone社製）含有eRDF培地（極東製薬社製）に馴化した。フラスコにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が９０％になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、10μm と0.2μmのフィルター（ゲルマンサイエンス社製）に供し、きょう雑物を除去した。

[実施例４] フローサイトメトリーによる抗ヒトc-Mpl抗体の結合活性評価

ハイブリドーマ培養上清もしくは精製抗体を用いたフローサイトメトリーによって、抗ヒトc-Mpl抗体の結合活性を測定した。手順は以下の通りである。細胞はFM3A-hMpl細胞もしくはヒトMpl発現FDCP2細胞（FDCP-hMpl）（FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34.参照）を用いた。

【０１３１】

反応あたり$4x10^5$個の細胞を50 μLのFACS staining medium（2% FBS, 0.1%NaN_3, 1mM EDTA in PBS）に懸濁し、50μLのハイブリドーマの培養上清もしくは精製ヒト抗体（終濃度0.1-1μg/mL）を加え、氷上にて30分間反応させた。FACS staining mediumによる洗浄後、二次抗体であるR-phycoerythrin （RPE）標識ヤギ抗ヒトIgγ F（ab’）抗体（Southern Biotechnology 社製Cat#2043-09）を加え、再び氷上で30分遮光反応させた後、再び洗浄した。細胞をPropidium Iodide（PI）を加えたFACS staining mediumに懸濁し、解析を行った。解析はFACS Calibur（Becton Dickinson社製）にて行った。

図１に各抗体の精製抗体を用いたフローサイトメトリーの結果を示す。各抗体はFDCP-hMpl細胞に結合したが、その親細胞であるFDCP2細胞（FDCP parent）には結合しなかった。従って、これらの抗体はヒトMpl特異的に結合していることが示された。

【０１３２】

[実施例５] UT7/TPO細胞を用いた抗ヒトc-Mpl抗体のアゴニスト活性評価

ハイブリドーマ上清もしくは精製抗体を用いて、UT7/TPO細胞増殖アッセイを行い、アゴニスト活性を評価した。UT7/TPO細胞はTPO依存性のヒト巨核球系細胞株である（Ozaki

K et al. Blood. 1998 Dec 15;92(12):4652-62.参照）。通常は10%FBS, 5ng/mL PEG-rHuMGDF添加 Iscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM）で培養、維持した。細胞増殖アッセイの手順は以下の通りである。

【０１３３】

(1) UT7/TPO細胞培養液を50mLチューブに移し、遠心分離（1,500rpm, 5min, 4℃）により細胞をペレットにした。培地を除き、サイトカイン非添加, 10%FBS添加 IMDM培地（以下、増殖アッセイ用培地）でペレットを懸濁した。再び遠心し、新しい増殖アッセイ用培地で懸濁した。遠心、懸濁をもう一度繰り返した。

【０１３４】

(2) 上記1.で増殖アッセイ用培地に懸濁した細胞を37℃, 5%CO_2条件下で６時間培養した。

(3) 培養後、細胞を遠心してペレットにし、増殖アッセイ用培地にて懸濁した。このとき、細胞濃度を6×10^5cells/mLにあわせ、細胞懸濁液を、各ウェル50μLで96-well plateに播いた。

【０１３５】

(4) 次に、ハイブリドーマ培養上清10μLに、増殖アッセイ用培地40μLを加え、各ウェルに添加する。精製抗体の場合は、増殖アッセイ用培地50μLに検体を終濃度の２倍の濃度で加え、各ウェルに添加した。

(5) 37℃, 5%CO_2にて、４８時間培養する。

(6) WST-8試薬（同仁化学研究所社製）を10μL/wellで添加し、2時間培養する。

【０１３６】

(7) 吸光マイクロプレートリーダー（TECAN社製SUNRISE RAINBOW）にて各ウェルの吸光度を測定する。（測定波長450nm, 参照波長600nm以上）

図２に7-10（図２A）, 4-49（図２B）, 6-4-50（図２C）, 6-5-2（図２D）各精製抗体を用いたUT7/TPO細胞増殖アッセイにおける増殖曲線を示す。また、スクリーニングの結果得られた抗ヒトc-Mpl抗体のサブクラス、活性の強さ(UT7/TPO細胞増殖アッセイにおける50%有効濃度（EC50）、最大活性(Max))、各抗体が得られた実施例２に記載の免疫方法を表２に示す。

【０１３７】

【表２】

表２

ハイブリドーマ	サブクラス	UT7/TPO (EC50)	UT7/TPO(Max)	免疫方法
2-35 非アゴニスト	IgG1	−	−	1
7-10	IgG1	++	>90%	1
4-49	IgG1	++	>80%	2
6-4-50	IgG1	+	>80%	3
6-5-2	IgG1	+	>50%	3
PEG-rHuMGDF	−	0.001-0.01nM	100%	−

+: EC_{50} 1-10nM
++: EC_{50} 0.1-1nM

【０１３８】

[実施例６] コロニーアッセイ

ヒト臍帯血由来CD34+ 細胞を用いたCFU-Mkコロニー形成アッセイを行い、精製抗体のヒトプライマリー細胞に対する作用を検討した。アッセイにはMegaCult™-C（Stem Cell Technologies社製Cat#04972）を使用した。手順は以下の通りである。

【０１３９】
(1) 検体を含んだ0.15mLのIMDMに、0.85mLのMegaCult™-C培地を加え1mLとした。
(2) ヒト臍帯血より調製したCD34+細胞を1.1x10^{5}cells/mLの濃度で、IMDMに懸濁し、上記1.の培地が入ったチューブに0.05mLずつ添加した。
(3) 細胞を加えた各チューブをボルテックスで攪拌し、0.6mLの氷冷したコラーゲン液を加え、再びボルテックスで攪拌した。
(4) 上記3.までの細胞、検体混合液をチャンバースライドの各ウェルに0.75mLずつ添加した。
【０１４０】
(5) チャンバースライドを、100mmペトリディッシュ中に入れた。乾燥を防ぐために、3mLの精製水を入れた35mmペトリディッシュを同じ100mmペトリディッシュ中に入れた。
(6) チャンバースライドが入ったペトリディッシュをインキュベーター中に静置し、37℃, 5%CO_2条件下で１０～１２日間培養した。
(7) 培養後、固定液（メタノール：アセトン＝１：３）にて固定した。
(8) 抗ヒトCD41抗体による免疫染色を行い、CFU-Mkコロニーを検出した。顕微鏡下でコロニー数をカウントし、各検体のCFU-Mkコロニー形成能を比較した。
【０１４１】
図３にコロニーアッセイの結果を示した。7-10_IgG1, 4-49_IgG1によってコロニー形成が誘導された。
【０１４２】
[実施例７] 抗体遺伝子クローニングと配列決定
組み換え抗体を作製するために、選抜された抗ヒトc-Mplアゴニスト抗体産生ハイブリドーマから抗体遺伝子、具体的には重鎖（H鎖）をコードするヒトIgγ cDNAおよび軽鎖（L鎖）をコードするヒトIgκ cDNAを単離し、配列を決定した。
【０１４３】
1）各モノクローナル抗体のcDNA合成
各ハイブリドーマで発現するヒト抗体重鎖、及び軽鎖の抗体の可変領域を含むDNA断片を取得するために、ヒトIgγ、及びヒトIgκの各々の定常領域に特異的なプライマーを用いた5’RACE（5' rapid amplification of cDNA ends）法によるクローニングを行なった。具体的には、BD SMART RACE cDNA Amplification Kit（ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）を用い、添付の説明書にしたがって実施した。
【０１４４】
cDNA合成の材料としては、ハイブリドーマ7-10, 4-49, 6-4-50, 6-5-2細胞にRNA抽出用試薬であるISOGEN（日本ジーン社製、日本）を添加し、取扱説明書にしたがってTotal RNAを精製した。精製したtotal RNAより各約1μgを鋳型として用いて、1st strand cDNAを作製した。
1st strand cDNA の合成は、
Total RNA 1μg/3μl
5’CDS 1μl
SMART Oligo 1μl
上記組成の反応液を70℃で２分間インキュベートした後、
5×Buffer 2μl
DTT 1μl
DNTP mix 1μl
PowerScript Reverse Transcriptase 1μl
を加え42℃で1.5時間インキュベートした。
【０１４５】
さらに、50μlのTricine -EDTA Bufferを加えた後、72℃で７分間インキュベートし、1st strand cDNAを取得した。
【０１４６】

2）PCRによる重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅と塩基配列の確認
2-1）PCRによる重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の増幅
ヒト抗体遺伝子のcDNAを増幅するために、ヒト抗体特異的配列を有する3’プライマー（具体的な配列は後記）とBD SMART RACE cDNA Amplification Kit で合成されたcDNAの5’末端に付加された配列に特異的にハイブリダイズする5’プライマー（Universal primer A mix）をPCR用のプライマーセットとして、またPCR用酵素としてKOD-Plus- DNAポリメラーゼ（東洋紡績（株）社製）を用いて、下記の反応液を調製してPCRに供した。
【０１４７】
sterile H_2O 28μl
cDNA 2.5μl
KOD-Plus- buffer (10X) 5μl
dNTP Mix (2mM) 5μl
$MgSO_4$ (25 mM) 2μl
KOD-Plus- (1 unit/μl) 1μl
Universal primer A mix (UPM) (10X) 5μl
Gene specific primers (GSP)（10μM） 1.5μl
Total volume 50μl
【０１４８】
重鎖遺伝子の増幅反応には、SMART RACE cDNA Amplification Kit付属のUPMプライマーとIgG1pプライマーを用い、他方、軽鎖遺伝子の増幅にはUPMプライマーとhk-2プライマーの各セットを使用した。
IgG1pプライマー：5’-TCTTGTCCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTG-3’（配列番号18）
hk-2：5’-GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC -3’（配列番号19）
【０１４９】
また反応温度条件は次のとおりである。
94℃ /30 秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復、
94℃ /30 秒間、70℃/30秒間、72℃/3分間のサイクルを5回反復、
94℃ /30 秒間、68℃/30秒間、72℃/3分間のサイクルを25回反復した。
【０１５０】
さらに、この反応液2μlにTricine -EDTA Buffer 98μlを加えて希釈したもの5μlを鋳型とし、第一PCRよりも内側にプライマーを設定した第二PCR（Nested PCR）を実施した。PCR反応溶液の組成を次に示す。
【０１５１】
sterile H_2O 30μl
第一PCR反応液（50倍希釈） 5μl
KOD-Plus- buffer (10X) 5μl
dNTP Mix (2mM) 5μl
$MgSO_4$ (25 mM) 2μl
KOD-Plus- (1 unit/μl) 1μl
Nested Universal primer A (NUP;10μM) 1μl
Gene specific primers (GSP)（10μM） 1μl
Total volume 50μl
【０１５２】
上記反応のプライマーセットとして、重鎖遺伝子増幅用の場合は、NUPMプライマー（SMART RACE cDNA amplification Kit付属；ベクトン・ディキンソン・バイオサイエンス・クローンテック社製）とhh2プライマー（4-49、6-4-50、6-5-2の場合）、或はIgG2p_134（7-10の場合）を使用して、また、軽鎖遺伝子の増幅の場合は、UPMプライマーとhk-5プライマーを用いた。反応温度条件としては、94℃の初期温度で1分間の後、94℃/5秒間、68℃/10秒及び72℃/3分間のサイクルを20回反復、最後に72℃/7分間加熱した。
【０１５３】

2-2）抗体遺伝子の塩基配列決定

上記の方法で増幅した重鎖PCR断片（以下HV[C]と記載）は、重鎖の5’非翻訳領域、リーダー配列（分泌シグナル配列）、可変領域（HV）及び定常領域の一部（[C]）より構成される。同様に、軽鎖のPCR増幅断片（以下LV[C]と記載）は、軽鎖の5’非翻訳領域、リーダー配列（分泌シグナル配列）、可変領域（LV）及び定常領域の一部（[C]）より構成される。ここでリーダー配列（分泌シグナル）とは抗体の分泌に必要で、成熟抗体タンパク質からは切り離されるアミノ酸配列である。HV[C]断片およびLV[C]断片は、PCR反応液からエタノール沈殿で回収した後、アガロースゲル電気泳動で分離し、メンブランを用いるDNA精製キットであるQIAquick Gel Extraction Kit （キアゲン社製）にて精製した。精製したHV[C]増幅断片あるいはLV[C]増幅断片は、それぞれZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)のpCR 4 Blunt- TOPO ベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列決定のためにプライマーとして、M13-20FW及びM13RVを用いた。

【０１５４】

hk-5：5’- AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC-3’（配列番号20）

hh2プライマー：5’- GCT GGA GGG CAC GG TCA CCA CGC TG -3’（配列番号21）

IgG2p_134：5’- TGCACGCCGC TGGTCAGGGC GCCTGAGTTC C -3’（配列番号22）

【０１５５】

アゴニスト抗体7-10の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするDNA塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【０１５６】

<7-10重鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGC
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCG
GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
TGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAATCTATGGTTCGGGGAGTTCCGTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCC
GTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA（配列番号23）

【０１５７】

<7-10重鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFD LWGRGTLVTV SS（配列番号24）

【０１５８】

<7-10軽鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGAC
CCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTG
CTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTC
CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAAC
TTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA（配列番号25）

【０１５９】

<7-10軽鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK（配列番号26）

【０１６０】

アゴニスト抗体4-49の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするDNA塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<4-49重鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGAGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGT
ACTGGGTCCGGCAAGTTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAACAGTGGTAGCATAGGCTATGCG
GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCGTTTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
TGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGCCCTATGGTTCGGGGAGTTCCCCCACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号27）

【０１６１】

<4-49重鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLVAILKGVQCEEQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMYWVRQVPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA
DSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALWFGEFPHYYGMDVWGQGTTVTVSS（配列番号28）

<4-49軽鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGAC
CCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTA
CTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTC
CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAAC
TTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT（配列番号29）

【０１６２】

<4-49軽鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSTLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKR（配列番号30）

【０１６３】

アゴニスト抗体6-4-50の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするDNA塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<6-4-50重鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGAATTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACCTTTGATAATTATGCCATGT
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTGACATAGGCTATGCG
GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
TGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGGGATGCGGGGTTCGGGGAGTTCCACTACGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAG
GGACCACGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号31）

【０１６４】

<6-4-50重鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDNYAMYWVRQAP
GKGLEWVSGISWNSGDIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDAG
FGEFHYGLDVWGQGTTVTVSS（配列番号32）

【０１６５】

<6-4-50軽鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGAC
CCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTG

CTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTC
CCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAAC
TTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT（配列番号
33）

【０１６６】

<6-4-50軽鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPWTFGQGTKVEIKR（配列番号34）

【０１６７】

アゴニスト抗体6-5-2の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードするDNA塩基配列、並びに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

<6-5-2重鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTGTGG
GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGC
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGTATAGGTTATGCG
GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
TGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAACCTATATGGTTCGGGGAGTGGGGAAACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号35）

【０１６８】

<6-5-2重鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVECGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPIWFGEWGNYYGMDVWGQGTTVTVSS（配列番号36）

【０１６９】

<6-5-2軽鎖核酸配列>（ATG開始コドンより可変領域C末端アミノ酸残基をコードするDNA配列まで）

ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTC
TCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACT
TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA
TTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGT（配列番号37
）

【０１７０】

<6-5-2軽鎖アミノ酸配列>（リーダー配列及び可変領域まで）

（下線で示すアミノ酸残基は分泌シグナルとなるリーダー配列を示す）

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIKR（配列番号38）

【０１７１】

[実施例８] 組換え抗体発現ベクターの構築

上記の方法でハイブリドーマからクローニングした抗体の可変領域を、ヒト抗体発現用ベクターに組み込み、様々な定常領域を持った組換え抗体発現ベクターを作製した。

【０１７２】

ヒト抗体発現用ベクター、N5KG1-Val Lark（以下N5KG1と略記）（IDEC Pharmaceuticals社製, US patent 6001358参照）は、組換え抗体を動物細胞に発現させる目的で使用されるプラスミドベクターである。N5KG1の構造を図４Ａに示した。N5KG1は、２つのCMV プロモーター／エンハンサーを持ち、それぞれの下流に重鎖および軽鎖可変領域遺伝子のクローニングサイトを持つ。さらにその下流には、ヒト重鎖定常領域（γ１）およびヒト軽鎖定常領域（κ）をコードする遺伝子配列をあらかじめ持っている。本ベクターの可変領域

クローニングサイトに任意の重鎖および軽鎖可変領域（リーダー配列＝分泌シグナル配列を含む）を、読み枠（フレーム）をあわせて組み込むことにより、軽鎖可変領域がヒトκ鎖定常領域と、重鎖可変領域がヒトγ１鎖定常領域と連結された抗体を発現させることができる。従って、本ベクターを導入された動物細胞は培養液中にIgG1抗体を産生する。

【０１７３】

同様に、発現ベクターN5KG4PE（IDEC Pharmaceuticals社製）は、IgG4PEの重鎖定常領域を持っている。IgG4PEとはIgG4に二つの変異（Ser228Pro, Leu235Glu）が入った配列である。Ser228Pro はIgG4の分子内架橋（S-S結合）による単量体形成を抑制する変異である。また、Leu235Gluは抗体依存性細胞傷害(Antibody-dependent cellular cytotoxicity : ADCC)活性を低減させる変異である。

【０１７４】

また、N5KG1のIgG1定常領域をIgG3に変換し、N5KG3を作製した。

さらに本実施例では、N5KG1, N5KG3, N5KG4PEをもとに、重鎖定常領域（特にヒンジ領域）に種々の改変を加えた発現ベクターを作製した。

【０１７５】

本実施例で定常領域に加えた改変は、第一に、抗体ドメイン間のサブクラスの入れ替えによるものである。抗体重鎖定常領域は、N末端側からCH1-ヒンジ-CH2-CH3というドメイン構造を持っている。本実施例では、このドメイン単位で各サブクラスの配列を組み合わせた重鎖定常領域を作製した。例えば、CH1およびヒンジ領域はヒトIgG3の配列であり、CH2およびCH3はヒトIgG1である重鎖定常領域を作製した。そして、このような重鎖定常領域を持つ抗体を、CH1/ヒンジ/CH2/CH3の順にサブクラスを表記し、IgG3/3/1/1と名付けた（以降はIgG3311というように“/”を省略して表記する）。また、例えば、ヒンジ領域はヒトIgG3の配列であり、CH1, CH2およびCH3はヒトIgG4PEである重鎖定常領域を作製した。このような重鎖定常領域を持つ抗体をIgG4344と名付けた。

【０１７６】

第二に、ヒトIgG3ヒンジ領域の改変体を作製した。抗体のヒンジ領域はアッパー（upper）ヒンジとミドル(middle)ヒンジに分けることができる。アッパーヒンジとはKabat EU numbering（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5thEd. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991)） による表記で216以降、226よりN末端側の配列を指す。ミドルヒンジとは、同表記で226以降、231よりN末端側の配列を指す。ヒトIgG3のヒンジ領域は、アッパーヒンジが１２アミノ酸、ミドルヒンジが５０アミノ酸から成る。さらにミドルヒンジは、５アミノ酸と１５アミノ酸×３回のリピート配列に分けられる（5+15x3=50）。本実施例では、IgG3ミドルヒンジの繰り返し配列を１回に短縮した変異体を作製した。このようなヒンジをG3h1と名付け、このタイプのヒンジを持つ抗体を、前述のドメイン単位の変異とあわせて、IgGx3xxh1（xは任意）というように表記した。

【０１７７】

第二に、ヒトIgG3ヒンジ領域の改変体を作製した。抗体のヒンジ領域はアッパー（upper）ヒンジとミドル(middle)ヒンジに分けることができる。アッパーヒンジとはKabat EU numbering（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5thEd. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991)） による表記で216以降、226よりN末端側の配列を指す。ミドルヒンジとは、同表記で226以降、231よ

また、IgG3のミドルヒンジ後半の繰り返し配列を無くした重鎖定常領域も作製した。このようなヒンジをG3uh（upper hingeの略）と名付け、IgGx3xxuhというように表記した。

【０１７８】

さらにG3uhヒンジにL217SとR228Pの変異を加えた重鎖定常領域を作製した。この変異にはG3uhヒンジをよりIgG4PEの配列に近づける意図がある。これをG3uhm（upper hinge mutationの略）と名付け、これを持つ抗体をIgGx3xxuhmと表記した。

図４Ｂに天然型のヒトイムノグロブリンと、IgG4PE, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh,

IgG4344uhmのヒンジ領域のアミノ酸配列を示す。

本実施例では抗Mplアゴニスト抗体の可変領域を用いて、以下の定常領域を持つ抗体の発現ベクターを作製した。

【０１７９】

IgG1, IgG4PE, IgG3311, IgG3331, IgG3344, IgG3344h1, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm

以下に各発現ベクターの作製法を記載する。

1）IgG1サブクラスの抗c-Mpl抗体発現ベクターの作製

1-1）抗ヒトc-Mpl抗体4-49_IgG1及び7-10_IgG1発現ベクターの作製

7-10と4-49については、N5KG1ベクターに最初に重鎖可変領域、次に、軽鎖可変領域の順に挿入して発現ベクターを作製した。

【０１８０】

発現ベクター作製の工程を図４Ｃに示す。7-10及び4-49それぞれのHV[C]およびLV[C]断片（実施例７に記載）を含むプラスミドDNAを鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5’末側SalI、3’末側NheI）を付加するようにデザインしたプライマーセットを用いて、重鎖および軽鎖のリーダー配列と可変領域のDNAをKOD-Plus- DNAポリメラーゼによるPCRで増幅した。このPCRにより増幅された、重鎖および軽鎖のリーダー配列＋可変領域を、それぞれHV断片、LV断片と表す。

【０１８１】

まず、N5KG1に7-10HV, 4-49HV断片の挿入を行った。HV断片増幅用のプライマーは、以下の通りである。

7-10；

HV断片5’用プライマー：40-3H5Sal

5’- AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAGTTGG GACTGAGCTG GATTT -3’（配列番号39）

HV断片3’用プライマー：40-3H3Nhe

5’- AGAGAGAGAG GCTAGCTGAG GAGACAGTGA CCAGGGTGCC A -3’（配列番号40）

4-49；

HV断片5’用プライマー：F24HSal

5’-AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT -3’（配列番号41）

HV断片3’用プライマー：C15H3Nhe

5’- AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3’（配列番号42）

【０１８２】

反応温度条件としては、94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/5秒間と68℃/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72℃/7分間加熱した。増幅されたDNA断片を制限酵素SalIとNheIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約430bpのDNAを回収し精製した。他方、N5KG1ベクターについては制限酵素SalI、NheI処理を順次行った後、脱リン酸化のためにAlkaline Phosphatase (E. coli C75)（宝酒造社製、日本）にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動とDNA精製キットで約8.9kbのDNAを回収した。これら2つの断片をT4 DNA ligase を用いてライゲーションして、大腸菌DH10Bへ導入して形質転換体を得た。得られた形質転換体のプラスミドDNAについてDNA塩基配列を解析して、重鎖定常領域の5’上流に、HV断片がフレームを合わせて挿入されたプラスミドDNA、N5KG1_7-10_Hv、及びN5KG1_4-49_Hvを取得した。

【０１８３】

続いて、これらHV断片が挿入されたプラスミドベクターにLV断片（軽鎖リーダー配列＋可変領域）の挿入を行なった。LV[C]断片を含むプラスミドDNAを鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5’末側BglII、3’末側BsiWI）を付加するようにデザインしたプライマーを用いて、LV断片をPCRで増幅した。LV増幅用プライマーは以下の通りである。

7-10；

LV断片5’用プライマー：165-1B_L18Bgl

5’- AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC-3’（配列番号43）

LV断片3’用プライマー：165_1B_L18_Bsi
5’- AGAGAGAGAG CGTACGTTTG ATCTCCACCT TGGTCCCTCC -3’（配列番号44）
4-49；
LV断片5’用プライマー：DNP_L1Bglp
5’- AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC -3’（配列番号45）
LV断片3’用プライマー：A27_R_N202
5’- AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGC-3’（配列番号46）
【０１８４】
反応は94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/5秒間と68℃/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72℃/7分間の保温という条件で実施した。精製したLVの増幅DNA断片は、pCR 4Blunt- TOPO ベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列決定のためにプライマーとして、M13-20FWとM13RVを用いた。挿入部分のDNA塩基配列解析を行い、鋳型としたLVと相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドDNA（TOPO_7-10_Lv、及びTOPO_4-49_Lv）を選択した。次に、それぞれのDNAを制限酵素BglIIとBsiWIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約400 bpのDNAを回収し精製した。その精製DNA断片と、制限酵素処理（BglII, BsiWI）及び、脱リン酸化処理を施した7-10或は4-49のHVが挿入されたベクター（約9.3kb）をT4 DNA ligase によりライゲーションした後、大腸菌DH10Bへ導入して形質転換体を得た。形質転換体について、DNA配列解析や制限酵素切断パターンを解析し、目的のプラスミドDNAを含むクローンを選択した。更に、得られた抗体発現プラスミドDNAの大量精製を行い、重鎖全領域と軽鎖全領域、及び、その挿入部位周辺のDNA塩基配列にクローニング工程での変異がないことを確認した。7-10_IgG1および4-49_IgG1発現ベクターは、各々N5KG1_7-10、及びN5KG1_4-49と名付けた。
【０１８５】
図４CにN5KG1_7-10、及びN5KG1_4-49の作製工程を図示した。
1-2）抗ヒトc-Mpl抗体6-4-50_IgG1及び6-5-2_IgG1抗体発現ベクターの作製
6-4-50、及び、6-5-2については、ヒト抗体発現用ベクターに最初に軽鎖可変領域、次に、重鎖可変領域の順に挿入して発現ベクターを作製した。
【０１８６】
6-4-50、及び、6-5-2抗体それぞれのLV[C]断片を含むプラスミドDNA（実施例７）を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5’末側BglII、3’末側BsiWI）を付加するようにデザインしたプライマーセットを用いて、LV断片（軽鎖のリーダー配列＋可変領域）のDNAをKOD-Plus- DNAポリメラーゼによるPCRで増幅した。プライマーは以下の通りである。
6-4-50；
LV断片5’用プライマー：208LF
5’-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC -3’（配列番号47）
LV断片3’用プライマー：62LP3Bsi
5’- AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG -3’（配列番号48）
6-5-2；
LV断片5’用プライマー：A27_F
5’-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTC -3’（配列番号49）
LV断片3’用プライマー：202LR
5’- AGAGAGAGAGCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGC -3’（配列番号50）
【０１８７】
反応温度条件としては、94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/5秒間と68℃/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72℃/7分間加熱した。増幅されたDNA断片を制限酵素BglIIとBsiWIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約400bpのDNAを回収し精製した。他方、N5KG1ベクターについては制限酵素BglIIとBsiWI処理を順次行った後、脱リン酸化処理とし

てAlkaline Phosphatase (E. coli C75) （宝酒造社製）にて処理した後に、アガロースゲル電気泳動とDNA精製キットで約8.9kbのDNAを回収した。これら2つの断片をT4 DNA ligase を用いてライゲーションして、大腸菌DH10Bへ導入して形質転換体を得た。インサートDNAを含む形質転換体のプラスミドDNAについてDNA塩基配列を解析して、LV断片がN5KG1のヒト抗体軽鎖定常領域をコードする5’上流にフレームを合わせて挿入されたプラスミドDNA、N5KG1_6-4-50_Lv、及びN5KG1_6-5-2_Lvを取得した。引き続いて、このLV断片が挿入されたプラスミドベクターにHV断片（重鎖のリーダー配列＋可変領域）の挿入を行なった。HV[C]を含むプラスミドDNA（実施例７）を鋳型として、末端に連結のための制限酵素部位（5’末側SalI、3’末側NheI）を付加するようにデザインしたプライマーを用いて、HV断片をPCRで増幅した。使用したプライマーは以下の通りである。

【０１８８】

6-4-50；

HV断片5’用プライマー：50-5-7Hsal

5’- AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAATTGG GACTGAGCTG GATTTT -3’（配列番号51）

HV断片3’用プライマー：C15H3Nhe

5’-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3’（配列番号52）

6-5-2；

HV断片5’用プライマー：F24HSal

5’- AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT-3’（配列番号53）

HV断片3’用プライマー：L66H3Nhe

5’- AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTC-3’（配列番号54）

【０１８９】

反応は94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/5秒間と68℃/45秒間のサイクルを35回反復し、最後に72℃/7分間の保温という条件で実施した。精製したHV断片の増幅DNA断片は、一度pCR4Blunt- TOPO ベクター（東洋紡績（株）製）にサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列決定のためにプライマーとして、M13-20FWとM13RVを用いた。挿入部分のDNA塩基配列解析を行い、鋳型としたHVと相違がなく、また、プライマー部分もデザインどおりの配列を有するプラスミドDNA（TOPO_6-4-50_Hv、及びTOPO_6-5-2_Hv）を選択した。次に、それぞれのDNAを制限酵素SalIとNheIで消化して、アガロースゲル電気泳動で約430 bpのDNAを回収し精製した。並行して制限酵素処理（SalIとNheI）、及び、脱リン酸化処理した6-4-50或は6-5-2のLV断片が挿入されたベクター（約9.3kb）に、インサートしたいDNA断片をライゲーションした後、大腸菌DH10Bへ導入して、得られた形質転換体から目的のプラスミドDNAを持つクローンを選択した。こうして得られた抗体発現プラスミドDNAの大量精製を行い、重鎖全領域と軽鎖全領域、及び、その挿入部位周辺のDNA塩基配列にクローニング工程での変異がないことを確認した。6-4-50_IgG1及び6-5-2_IgG1抗体発現ベクターを、それぞれN5KG1_6-4-50、及びN5KG1_6-5-2と名付けた。

図４ＤにN5KG1_6-4-50、及びN5KG1_6-5-2の作製工程を図示した。

【０１９０】

2）IgG4PEサブクラスの抗ヒトc-Mpl抗体の作製

IgG4PEサブクラス抗体の発現ベクター作製には前述のN5KG4PEベクターを用いた。N5KG4PEのプラスミドDNAを制限酵素NheIとBamHIで切断して、重鎖定常領域を含む断片を精製して、抗c-Mpl抗体であるN5KG1_7-10、及びN5KG1_4-49の同じ制限酵素部位内につなぎ換えることにより、N5KG4PE_7-10、及びN5KG4PE_4-49を作製した。

【０１９１】

3）N5KG3の作製

ヒトIgG3用発現ベクターN5KG3はN5KG1のIgG1重鎖定常領域を下記配列のIgG3定常領域に置換することで作製した。

IgG3定常領域アミノ酸配列

STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY

TCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
NTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK*（配列番号55）

【０１９２】

IgG3定常領域塩基配列

CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGTTTGGGCACCCAGACCT
ACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGACACA
ACTCACACATGCCCACGGTGCCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCACGGTGCCCAGAGCCCAAATC
TTGTGACACACCTCCCCCATGCCCACGGTGCCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGATACCCTTATGATTTCCCGGACCCCT
GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
ACAACACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCCGGGTAAATGA（配列番号56）

【０１９３】

4）IgG3311発現ベクターの作製

IgG3311発現ベクターは、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH，13ch1-Rで98℃１秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG1を鋳型として、プライマー13ch1、linkH2を用いて、98℃１秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃１秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI，BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3311と名づけた。

linkH: GGG TAC GTC CTC ACA TTC AGT GAT CAG（配列番号57）

13ch1-R: GTC TTC GTG GCT CAC GTC CAC CAC CAC GCA（配列番号58）

13ch1: TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC（配列番号59）

linkH2: TGA TCA TAC GTA GAT ATC ACG GC（配列番号60）

【０１９４】

5）IgG3331発現ベクターの作製

IgG3331発現ベクターは、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH，CH3consRで98℃１秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG1を鋳型として、プライマーCH3cons、linkH2を用いて、98℃１秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃１秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI，BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3331と名づけた。

CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC（配列番号61）

CH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC（配列番号62）

以下に、IgG3344，IgG3344h1，IgG4344，IgG4344h1，IgG4344uh，IgG4344uhmの作製法を記す。これらについては、各定常領域をPCR法によって増幅し、それをクローニングしたプラスミドを作製した。ついで、それら改変定常領域をN5KG1_7-10等のIgG1定常領域と置換した。

【０１９５】

6）IgG3344，IgG3344h1定常領域の作製

IgG3344発現ベクターは、N5KG3331およびN5KG4PEを鋳型として、PCRを用いた変異導入（Overlap Extention法による部位特異的変異導入法）によって以下の手順で行った。

【０１９６】

N5KG3331を鋳型として、プライマーとしてG3G4_P1_FとG3G4_P2_Rを用いて94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/15秒間、55℃/10秒間、そして68℃/1分間のサイクルを35回反復し、最後に72℃/7分間加熱した。同時に、前述発現ベクターN5KG4PEを鋳型として、プライマーとしてG3G4_P3_FとG3G4_P4_Rを用いて同条件にてPCRを実施した。増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit （キアゲン社製）にて精製した。これらの精製DNA断片を等量混合した後、最初の5サイクルについては、2DNA断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/10秒間、55℃/10秒間、そして68℃/1.5分間という５サイクルの伸長反応を行なった後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてG3G4_P1_FとG3G4_P4_Rを加えて、更に94℃/5秒間と68℃/2分間のサイクルを20回反復し、最後に72℃/7分間の加熱を行なった。G3G4_P1_FとG3G4_P4_Rのプライマーは、ヒト抗体定常領域のコード部分を切りだして、抗体の発現ベクターの該当する部分に変更可能とするために制限酵素部位（G3G4_P1_FにNheI、G3G4_P4_RにBamHI部位）が存在する。増幅したPCR断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kitにて精製した。精製した増幅断片は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)のpCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりIgG3344およびIgG3344h1定常領域を持つクローンを選択した。

【０１９７】

G3G4_P1_F：5’-AGAGAGGCTA GCACCAAGGG CCCATCG-3’（配列番号63）
G3G4_P2_R：5’-GAACTCAGGT GCTGGGCACC TTGGGCACG-3’（配列番号64）
G3G4_P3_F：5’- CCAAGGTGCC CAGCACCTGA GTTCGAGGGG GGA -3’（配列番号65）
G3G4_P4_R：5’- AGAGAGGGAT CCTCATTTAC CCAGAGACAG GGA -3’（配列番号66）

【０１９８】

7）IgG4344定常領域の作製

IgG4344発現ベクターの作製においては、N5KG3331を鋳型として、プライマーとしてG434_P5_FとG434_P6_Rを用いて94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/15秒間、55℃/10秒間、そして68℃/1分間のサイクルを35回反復し、最後に72℃/7分間加熱した。同時に、N5KG4PEを鋳型として、プライマーとしてG434_P7_FとG3G4_P2_Rを用いて同条件にてPCRを実施した。増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit （キアゲン社製）にて精製した。これらの精製２DNA断片と、前述したN5KG4PEを鋳型として、G3G4_P3_FとG3G4_P4_Rをプライマーとして増幅・精製しておいたDNA断片の計3種類のOverlap Extention反応を実施した。すなわち、３種類のDNA断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて94℃の初期温度で1分間の加熱後、94℃/10秒間、55℃/10秒間68℃/1.5分間のサイクルを5回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてG434_P5_FとG3G4_P4_Rを加えて、94℃/5秒間と68℃/2分間のサイクルを20回反復し、最後に72℃/7分間の加熱を行なった。増幅したPCR断片はQIAquick Gel Extraction Kitにて精製した後、pCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりIgG4344定常領域を持つクローンを選択した。

【０１９９】

G434_P5_F：5’- AGAGAGGCTA GCACCAAGGG GCCATCC -3’（配列番号67）
G434_P6_R：5’- GGTTTTGAGC TCAACTCTCT TGTCCACCTT GGTGTTGC -3’（配列番号68）
G434_P7_F：5’- GTGGACAAGA GAGTTGAGCT CAAAACCCCA CTTGGTGACA C -3’（配列番号69）

【０２００】

8）IgG4344h1定常領域の作製

IgG4344h1発現ベクターの作製は、N5KG4344を鋳型として、プライマーとしてG434_P5_F, G434_P6_Rを用いて98℃の初期温度で10秒間の加熱後、98℃/10秒間、55℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを7回反復し、次いで98℃/10秒間、68℃/1分間のサイクルを30回反復して、最後に72℃/7分間加熱した。PCR用酵素としては、Pyrobest DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社）を使用した。同時に、N5KG3344h1を鋳型として、プライマーとしてG434_P7_FとG3G4_P4_Rを用いて同条件にてPCRを実施した。増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kit （キアゲン社製）にて精製した。これらの精製DNA断片を等量混合した後、２DNA断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、98℃の初期温度で10秒間の加熱後、98℃/10秒間、55℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを7回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてG434_P5_FとG3G4_P4_Rを加えて、更に98℃/10秒間と68℃/1分間のサイクルを30回反復し、最後に72℃/7分間の加熱を行なった。増幅したPCR断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kitにて精製した。精製した増幅断片は、pCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりG4344h1定常領域持つクローンを選択した。

【０２０１】

9）IgG4344uh定常領域の作製

G4344uhの作製は、N5KG4344を鋳型として、プライマーとしてG434_P5_Fと17-1Rを用いて98℃の初期温度で10秒間の加熱後、98℃/10秒間、50℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを5回反復し、次いで98℃/10秒間、55℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを5回反復し、98℃/10秒間、68℃/1分間のサイクルを25回反復して、最後に72℃/7分間加熱した。PCR用酵素としては、Pyrobest DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社）を使用した。並行して、N5KG3344h1を鋳型として、プライマーとして17-2FとG3G4_P4_Rを用いて同条件にてPCRを実施した。増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kitにて精製した。これらの精製DNA断片を等量混合した後、２DNA断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、98℃の初期温度で10秒間の加熱後、98℃/10秒間、68℃/1分間のサイクルを5回、さらに98℃/10秒間、55℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを5回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてG434_P5_FとG3G4_P4_Rを加えて、更に94℃/30秒間と68℃/1分間のサイクルを30回反復し、最後に72℃/7分間の加熱を行なった。増幅したPCR断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kitにて精製した。精製した増幅断片は、pCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりIgG4344uh定常領域を持つクローンを選択した。

【０２０２】

17-1R：5’- AGGTGCTGGG CACCGTGGGC ATGTGTGAGT TGT -3’（配列番号70）

17-2F：5’- CACACATGCC CACGGTGCCC AGCACCTGAG TTC -3’（配列番号71）

【０２０３】

10）IgG4344uhm定常領域の作製

IgG4344uhm発現ベクターの作製は、N5KG4PEを鋳型として、プライマーとしてG434_P5_Fと17m-1Rを用いて98℃の初期温度で10秒間の加熱後、98℃/10秒間、50℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを5回反復し、次いで98℃/10秒間、55℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを5回反復し、98℃/10秒間、68℃/1分間のサイクルを25回反復して、最後に72℃/7分間加熱した。PCR用酵素としては、Pyrobest DNA Polymeraseを使用した。並行して、N5KG4PEを鋳型として、プライマーとして17m-2FとG3G4_P4_Rを用いて同条件にてPCRを実施した。増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kitにて精製した。これらの精製DNA断片を等量混合した後、２DNA断片のオーバーラップ部分をアニーリングさせて、94℃/30秒間、55℃/30秒間、そして72℃/1分間のサイクルを7回反復して伸長した後、全長を増幅させる為に反応液にプライマーとしてG434_P5_F

とG3G4_P4_Rを加えて、更に94℃/30秒間と68℃/1分間のサイクルを30回反復し、最後に72℃/7分間の加熱を行なった。増幅したPCR断片は、アガロースゲル電気泳動で回収し、QIAquick Gel Extraction Kitにて精製した。精製した増幅断片は、pCR 4 Blunt- TOPO ベクターにサブクローニングを行い、得られたクローンのプラスミドDNAについてインサートDNAの塩基配列を解析した。塩基配列の解析よりIgG4344uhm定常領域を持つクローンを選択した。

【０２０４】

17m-1R：5’- TGTGTGAGTT GTGTCACCAA GTGGGGTTTT GGACTCAACT CTCTTGTCCA CCTTGGT -3’（配列番号72）

17m-2F：5’- ACCCCACTTG GTGACACAAC TCACACATGC CCACCATGCC CAGCACCTGA GTTCGAG -3’（配列番号73）

図４Ｅに各種改変重鎖のアミノ酸配列を示した。

【０２０５】

11) 各種改変重鎖定常領域を持った抗体発現ベクターの作製

作製した各種改変重鎖定常領域を持つプラスミドDNAを、制限酵素NheI, BamHIで切断後、定常領域配列を精製分離した。続いて、抗ヒトc-Mpl抗体発現ベクターN5KG1_7-10, N5KG1_4-49, N5KG1_6-4-50, N5KG1_6-5-2を同酵素で処理し、定常領域を置換した。

【０２０６】

図４Ｆに7-10_IgG4344uhmの重鎖配列を示した。

図４Ｇに7-10_IgG4344uhmの軽鎖配列を示した。

【０２０７】

[実施例９] 抗ヒトc-Mpl抗体の293F細胞での一過性発現、及び精製

実施例８で作製した発現ベクターDNAをEndoFree Plasmid Kit（キアゲン社）にて調製し、FreeStyleTM 293 Expression System（インビトロジェンライフテクノロジー社）を用いて浮遊性293細胞（インビトロジェンライフテクノロジー社）に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。孔径0.22μm のメンブランフィルター（MILLIPORE 製）で濾過した培養上清（IgGとして約500μg）を抗体精製用アフニティーカラムであるHiTrap rProtein A FF（カラム体積1ml）（アマシャムバイオサイエンス社）にチャージし、PBS (-)で洗浄後20 mMクエン酸バッファー（pH3.4）により溶出し、200 mMリン酸バッファー（pH7.0）を含むチューブに回収した。

【０２０８】

[実施例１０] 組換え型抗体の作製

構築した抗体発現ベクターを宿主細胞に導入して、抗体発現細胞を作製した。発現のための宿主細胞には、dhfr欠損のCHO DG44 細胞（IDEC Pharmaceuticals Corporation）を無血清培地であるEX-CELL325PF（JRH）に馴化した細胞株を用いた。宿主細胞へのベクターの導入はエレクトロポレーションにより実施した。エレクトロポレーションは抗体発現ベクター約2μgを制限酵素AscIで線状化し、Bio-Rad electrophoreterをもちいて350V、500μFの条件で、4×10^6個のCHO細胞に遺伝子を導入し、96well culture plateに播種した。ベクターの導入処理後、G418を添加して培養を継続した。コロニーを確認した後、抗体発現株を選別した。選択したCHO細胞株をEX-CELL325-PF培地（JRH）（2 mM glutamine、100 units/ml penicillin、100 μg/ml streptomycin、 hypoxanthine and thymidine (HT) サプリメント(1:100) (Invitrogen)を含む）で5% CO_2条件下で培養した。培養上清をMabselect Protein A カラム(Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.)に吸着後、PBSで洗浄して、20mMクエン酸-Na、50mM NaCl (pH3.4)バッファーで溶出した。溶出液は50mM Phosphate-Na, pH7.0 にて中和した。Milli-Q水にて、約1.5倍に希釈してConductivityを4.0ms/cm以下に調製した。次に、Q-Sepharose（Hitrap Q HP）(Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.)と、SP-Sepharose（HiTrap SP FF）(Amersham Pharmacia Biotech, Co., Ltd.)を連結したカラムに、サンプルをチャージして吸着後、20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）にて洗浄後、1×PBSバッファーにて溶出した。調製された抗体溶液は、孔径0.22μmのメンブランフィルターMILLEX-GV （ミリポア社製）でろ過滅菌した。精製した抗体

の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/mL を1.4 ODとして算出した。

【０２０９】

組換え型の改変抗体を用いて、UT7/TPOアッセイ（実施例５）における活性を測定した。4-49_IgG1に比べ、IgG3311とIgG3331は活性の増強が見られた（図５A）。7-10_IgG4344uhmおよび4-49_IgG4344uhmはPEG-rHuMGDFと同等の活性を示した。

【０２１０】

表３に各種改変抗体の活性をまとめた。全てのアゴニスト抗体に関して、定常領域改変による活性の増強が見られた。7-10，4-49に関しては、IgG1とIgG4PEは同等の活性であったが、IgG4344uhmはIgG4PEに比べ高活性であった。IgG4344uhmは、IgG4PEのアッパーヒンジ部７アミノ酸配列中のC末側４－７位がIgG３のアッパーヒンジ１２アミノ酸配列中の４－１２位の配列に置き換わっている（図４B参照）。従って、この部分が活性の増強に重要であると考えられる。

【０２１１】

【表３】

表３

	2-35	7-10	4-49	6-4-50	6-5-2
IgG1	–	++	++	+	+
IgG4PE	NT	++	++	NT	NT
IgG3311	NT	+++	+++	++	++
IgG3331	NT	+++	+++	NT	NT
IgG3344	NT	+++	NT	NT	++
IgG3344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uh	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uhm	NT	+++	+++	NT	NT

+: EC_{50} 1-10nM
++: EC_{50} 0.1-1nM
+++: EC_{50} 0.01-0.1nM
NT: 試験せず

【０２１２】

[実施例１１] アゴニスト抗体によるシグナル伝達

TPOが受容体であるc-Mplに結合すると、細胞内タンパク質のリン酸化が起こる。TPOによって活性化する主要な経路は、Jak-STAT，Ras-MAPK，PI3K-Aktの３つが知られている。アゴニスト抗体によるc-Mpl下流のリン酸化シグナル伝達の解析を行った。解析は、リン酸化タンパク質特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法で行った。以下に使用した抗体を列記する。抗STAT5（Cell Signaling社製，Cat#9352），抗phospho-STAT5（Cell Signaling社製，Cat#9351L），抗JAK2（Upstate社製，Cat#06-255），抗phospho-JAK2（Upstate社製，Cat#07-606），抗Erk1/2（Cell Signaling社製，Cat#9272），抗phospho-Erk1/2（Cell Signaling社製，Cat#9271L），抗Akt（Cell Signaling社製，Cat#9102），抗phospho-Akt（Cell Signaling社製，Cat#9101S）。

【０２１３】

これら抗体を使用し、以下の手順でアッセイを行った。

1）UT7/TPO細胞をサイトカイン非添加IMDM培地で洗浄し、６時間培養した。

2）培養後、細胞を1×106cells/mLに調製し、6-wellプレートに2mL/wellで播いた。

3）ウェルに、アゴニスト抗体または陽性コントロールとしてPEG-rHuMGDFを添加し、細胞を刺激した。

4) 最短5分～最長2時間の刺激時間の後に細胞を回収し、氷冷PBSにて細胞を洗浄した。

5) 遠心分離で細胞をペレットにし、上清を除去後、PhosphoSafe™ Extraction Reagent（Novagen社製，Cat#71296）でペレットを溶解したのち、再度遠心して、上清（細胞抽出液）を回収した。

6) 上記5.の細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロット法でリン酸化タンパク質を検出した。

【０２１４】

結果を図６に示す。アゴニスト抗体7-10G4344uhmおよび4-49G4344uhmによって、TPOシグナルと同様の経路のリン酸化が見られた（図６A）。抗体6-5-2については、IgG1はJak2，STAT5のリン酸化が観察されなかったが、IgG3344はJak2，STAT5のリン酸化が見られた（図６B）。

【０２１５】

[実施例１２] ヒト血小板に対するプライミング作用検討

TPOはそれ自体では血小板凝集を起こさないが、ADP等の凝集惹起物質による血小板凝集を促進する作用（プライミング作用）がある。アゴニスト抗体によるヒト血小板プライミング作用を以下の手順で調べた。

【０２１６】

1) 抗凝固剤として、3.1%(w/v)クエン酸三ナトリウムを１０分の１容量加えた、健常人の末梢血を遠心分離（140g，15min）し、多血小板血漿（Platelet Rich Plasma、以下 PRP）を調製した。

2) さらに遠心分離（2500g，15min）して血球成分を沈殿させ、血漿を採取した。

3) PRPに含まれる血小板数を測定し、血漿を用いて血小板数を$3x10^5$/μLにあわせた。

4) 上記3.で調製した血小板浮遊液100μLに検体を加え、攪拌しながら３分間インキュベーションした。

5) 30μM ADP（SIGMA社製）を5μL添加し、血小板凝集による濁度の低下を測定した。測定にはMCメディカル社製，Hematracer801を用いた。

【０２１７】

結果を図７に示す。ADP添加条件下で、アゴニスト抗体によるプライミング作用が観察された。抗体単独（ADPなし）では、血小板凝集は起こらなかった。

【０２１８】

[実施例１３] カニクイザル投与

アゴニスト抗体をカニクイザルに投与し、血小板数の変動を解析した。使用個体のTPOに対する反応性を確かめるため、初日（Day0）にPEG-rHuMGDF（10μg/kg）を静脈内投与し３週間経過を観察した後、初回投与後２１日目に精製アゴニスト抗体7-10G4PE（個体Ａ）7-10G3344h1（個体Ｂ）を用量1mg/kgで静脈内投与した。

【０２１９】

結果を図８に示す。A,B両方の個体でPEG-rHuMGDFによる一過性の血小板上昇が見られた。個体Ｂではアゴニスト抗体7-10G3344h1投与後に、血小板数の上昇が見られた。また、抗体投与による重篤な毒性は見られなかった。

【０２２０】

[実施例１４] ヒト臍帯血移植モデルにおける作用検討

実施例10で作製したアゴニスト抗体が、ヒト臍帯血移植モデルにおけるヒト造血系の構築を促進することを確認するため、以下の手順で実験を行った。

【０２２１】

・ NOG（NOD/SCID/IL2-γR KO）マウス（実験動物中央研究所（日本国神奈川県川崎市）より購入）に移植前処置として放射線照射（2グレイ）を行い、ヒト臍帯血由来CD34+細胞を1,000ないし10,000個、尾静脈より注入移植した。

・ 移植後一日目に最初の被検物質投与を行い、その後、週に一回投与を実施した。群構成と各々の被検物質および投与量は下記のとおりである。匹数は各群６匹、投与は腹腔内投与で行った。また、毎週の投与時に体重測定を行った。

【０２２２】
＜群構成，被検物質，投与量＞
I: 移植数10,000，PBS（コントロール）投与
II: 移植数1,000，PBS投与
III: 移植数10,000，抗体7-10G4344uhm投与，100μg/head/week
IV: 移植数1,000，抗体7-10G4344uhm投与，100μg/head/week
V: 移植数10,000，TPO (PEG-rHuMGDF)投与，5μg/head/week
VI: 移植数1,000，TPO (PEG-rHuMGDF)投与，5μg/head/week
・ 移植前１日と移植後２、４、６週に末梢血の解析を行った。末梢血解析の手順は下記のとおりである。
【０２２３】
＜末梢血解析手順＞
・ キャピラリーを用いて、マウス眼窩静脈より末梢血（約70μL）を採取した。
・ KX-21自動血球解析システム（Sysmex社製）を用いて血球数を測定した。
・ ヒト血小板および白血球のキメラ率を調べるため、以下のAおよびBに挙げた各抗体の組み合わせで染色し、FACS Caliburで解析した。Ａ（血小板解析用）:ＰＥ標識－抗ヒトCD41抗体（Dako社製 R7058）＋ＦＩＴＣ標識－抗マウスCD41抗体（BD Pharmingen社製#553848）、Ｂ（白血球解析用）: ＡＰＣ標識－抗ヒトCD45抗体（ベックマン・コールター社製IM2473）＋ＦＩＴＣ標識－抗マウスCD45抗体（BD Pharmingen社製#553080）。また、解析の際に定量用の蛍光ビーズ（フローカウントビーズ）を加え、一定量の血液を解析できるようにした。
・ 血小板・白血球ともに、ヒト細胞数／（ヒト細胞数＋マウス細胞数）×１００（%）、という式でキメラ率を算出した。末梢血中の全血小板数とキメラ率を乗じることにより、ヒト血小板数を算出した。
【０２２４】
・ ６週目にマウスを屠殺し、大腿骨から骨髄細胞を採取した。それを用いてコロニーアッセイを行い、ヒトの巨核球系(MK)および赤血球系（E）、顆粒球・マクロファージ系(GM)の前駆細胞の数を測定した。巨核球系前駆細胞（CFU-Mk）を検出するコロニーアッセイは、培養中にTPO（50ng/mL）とSCF (100ng/mL)を加えて行った。37℃、5%CO_2条件下で１２日間の培養を行った。コロニーの検出は実施例６と同様に抗ヒトCD41抗体を用いて行った。赤血球系、顆粒球・マクロファージ系の前駆細胞を検出するコロニーアッセイは、Methocult system（Stem Cell Technologies社製）を用いて、培養中にEPO（4IU/mL），SCF(100ng/mL)，IL-3（20ng/mL），GM-CSF(10ng/mL)を加えて行った。37℃，5%CO_2，5%O_2条件下で１４日間の培養を行った。培養後、顕微鏡下でコロニーのカウントを行った。
【０２２５】
図9A、9B及び9Cに本実験の結果を図示した。
移植後６週の時点において、抗体投与群では、他群に比べ、末梢血ヒト血小板数が有意に高かった（図9A）。これにより、アゴニスト抗体7-10G4344uhmは臍帯血移植時の血小板回復を促進することが示唆された。さらに抗体投与群では、骨髄中のヒト赤血球系および顆粒球・マクロファージ系前駆細胞の数が有意に高かった（図9B）。またマウス白血球に対するヒト白血球の割を示すCD４５キメラ率においても有意に高かったことから、抗体投与群においてヒト白血球が増加していることがわかる（図9C）。このことは7-10G4344uhmが巨核球系のみならず、他系列の細胞の生着も促進できる可能性を示唆している。
【０２２６】
これらの知見から、アゴニスト抗体は、血球が巨核球系・赤血球系・顆粒球・マクロファージ系に分かれるより上流の細胞に作用していることが示唆された。Mplが造血幹細胞に発現しているという知見とあわせて考えると、アゴニスト抗体は造血幹細胞の増殖を促進している可能性が高い。
【０２２７】
ちなみに本実験ではTPO投与群では同様の効果が見られなかった。これに対しては、TPO

がマウス造血細胞にも作用するため、TPO投与群では骨髄中でヒト細胞とマウス細胞の競合が起こり、純粋にヒト細胞に対する作用を観察できていない可能性を考慮しなければならない。本アゴニスト抗体は、ヒトMplにしか作用しないことを特徴とすることから、Mplを介したシグナルがヒト臍帯血造血幹細胞の増幅に効果があることを、in vivoで初めて明らかにすることができた。

【０２２８】

[実施例１５] ヒンジ改変抗体の抗原性解析

本発明のアゴニスト抗体はヒンジ部分の改変によって活性を増強していることを特徴としているが、改変による抗原性の上昇が懸念された。そこで、ヒンジ改変体である7-10G4344uhmのアミノ酸配列をもとに、コンピュータ上での抗原性予測を実施した。

【０２２９】

体内に投与された外来タンパク質は樹状細胞、マクロファージ等の抗原提示細胞（APC）に取り込まれ、分解された後、ペプチドが主要組織適合抗原複合体（MHC）クラスII分子（ヒトの場合HLA class II, HLA-DR, DQ, DP）によって抗原提示される。APCによって提示されたペプチドはT細胞受容体（TCR）によって認識され、Ｔ細胞を活性化させる。活性化されたT細胞（ヘルパーＴ細胞）は同抗原を認識する抗体を発現するＢ細胞を活性化し、外来タンパク質に対する抗体が産生される。この機構の中で、ペプチドとMHCクラスII分子との親和性が抗原性を規定する大きな要因となっている。ヒトのMHCクラスII分子には多くの型（多型）があり、同じペプチドであってもクラスII分子の型によって親和性は大きく異なることが知られている。

【０２３０】

そこで、7-10G4344uhmとIgG4PEの定常領域を持つ別のヒト抗体のアミノ酸配列を、様々な型のヒトHLA-DR, DQ, DP分子との親和性を解析した（HLA分子のデータベースおよび、解析のアルゴリズムはAlgoNomics社より提供された）。

【０２３１】

その結果、ヒンジ改変による新たなエピトープ出現はなかった。本改変抗体を医薬品として利用する際に抗原性の問題はないことが示唆された。

【０２３２】

[実施例１６] ヒトMplトランスジェニックマウスへの抗体投与

本発明の抗体はマウスMplには交叉しないため、薬効を測定するため、外来遺伝子としてヒトMplを導入したトランスジェニック（Tg）マウスを作製し、抗体を投与する実験を行った。まず、マウスMplのプロモーター領域5.5kbをPCRで増幅し、pBluescriptプラスミドベクターにクローニングした。次に、ヒトMplの翻訳領域および3’側非翻訳領域をPCRで増幅し、マウスMplプロモーター下流に連結した。このコンストラクトをC57BL/6マウス受精卵に注入し、受精卵を仮親に戻し出産させた。生後３週経過した時点で尻尾からゲノムDNAを抽出し、PCRでTgマウスを選別した。得られたTgマウス個体をC57BL/6と交配し、系統化した。骨髄でのヒトMplの発現解析を行った。

【０２３３】

その結果、複数のヒトMplを持つTgマウス系統が得られた。そのうち、39L系統の骨髄ではヒトMplが発現していることがRT-PCRで確認された。39L系統のマウスを用いて抗体の薬効を確認した。

アゴニスト抗体7-10G4344uhmを単回投与（3又は10μg/mL）し、末梢血中の血小板数の推移を、KX-21自動血球解析装置を用いて調べた。末梢血の採取は眼窩静脈より行い、毎週測定を行った。陽性コントロールとしてTPO (PEG-rHuMGDF)を用いた。群構成は以下のとおりである（各群６匹）。

【０２３４】

I: 7-10G4344uhm 10μg投与群
II: 7-10G4344uhm 3μg投与群
III: TPO 3μg投与群
IV: PBS投与群

VI: 野生型マウス 7-10G4344uhm 10μg投与群

【０２３５】

結果を図10に示す。抗体投与群、TPO投与群で血小板が増加した。TPO投与群は投与後２週間でほぼベースラインに戻った。これに対して抗体投与群は投与後一ヶ月を経過しても血小板数は上昇したままであった。この結果から、アゴニスト抗体は血中で非常に安定であり、単回投与で長期にわたって血小板造血を促進できることが示唆された。このことから、特にアゴニスト抗体は慢性血小板減少症の治療に適していることが示唆された。

[実施例１７] 7-10G4344uhm軽鎖変異体の活性評価

アゴニスト抗体7-10の軽鎖可変領域(7-10VL)のフレームワーク領域に変異を導入し、結合活性及びアゴニスト活性に与える影響を調べた。軽鎖の変異体はアゴニスト抗体4-49の軽鎖（V104L）、アゴニスト6-4-50の軽鎖のアミノ酸を１つ置換したもの（A43V,G100Q）の３種である。これら変異軽鎖と7－10G4344uhm重鎖を組み合わせた抗体を作製したところ、全て、結合活性、アゴニスト活性ともにオリジナルの7-10G4344uhmと同等であった。一方で、アゴニスト抗体7-10の軽鎖可変領域の相補性決定領域（CDR領域）に変異(Y94F)を導入した場合、結合活性、アゴニスト活性ともに10分の１程度に低下した。この結果から軽鎖アミノ酸配列には、ある程度の自由度があることが示された。

各変異体の軽鎖アミノ酸配列及び7-10VLのアミノ酸配列は、以下のとおりである。なお、変異部は太字と下線で示した。

【０２３６】

7-10VL（配列番号３）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

7-10VL_V104L（4-49VL;配列番号85）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKLEIK

7-10VL_G100Q（6-4-50VL置換体1;配列番号86）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSYPLTFGQGTKVEIK

7-10VL_A43V（6-4-50VL置換体2;配列番号87）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

7-10VL_Y94F（CDR置換体;配列番号88）：

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSFPLTFGGGTKVEIK

【０２３７】

結合活性解析：各抗体の濃度を1，0.1，0.01μg/mLに調製し、FM3A-hMpl細胞を用いたフローサイトメトリーを行った。実験方法は実施例４に記載の方法で行った。コントロールに抗DNP（ジニトロフェノール）抗体（サブクラスIgG4;ヒト抗体）を用いた。軽鎖変異抗体は7-10G4344uhmと同等の結合活性を示した（図11）。

アゴニスト活性解析： 実施例５に記載の方法で、UT-7/TPO細胞を用いた細胞増殖アッセイを行った。軽鎖変異抗体は7-10G4344uhmと同等のアゴニスト活性を示した（図12）。

【産業上の利用可能性】

【０２３８】

本発明により、種々の血小板減少症に対する治療薬として利用できる、抗ヒトcMplアゴニストヒト抗体が提供された。また他のアゴニスト抗体にも応用し得る、高い安全性と薬効を期待し得る、抗体の定常領域が提供された。

本発明により、全長抗体でヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)を活性化しうるヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体が提供される。このアゴニスト抗体は、種々の血小板減少症に対する治療薬として使用可能であり、医療産業上多大な寄与が期待される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書

にとり入れるものとする。

【図面の簡単な説明】

【０２３９】

【図１】図１は、アゴニスト抗体結合活性を示す。FDCP-hMpl細胞とFDCP2細胞（FDCP parent）を用いたフローサイトメトリー（実施例２）で、図示した各抗体の結合活性を調べた。各抗体はヒトc-Mpl特異的に結合することが示された。

【図２】図２は、UT7/TPOアッセイ結果を示す。図Ａ～Ｄに示した各精製抗体（IgG1）のUT7/TPO細胞増殖アッセイ（実施例５）における各抗体の増殖曲線を示した。

【図３】図３は、CFU-Mkアッセイ結果を示す。これは、ヒト臍帯血CD34+細胞を用いたコロニー形成アッセイ（実施例６）の結果である。

【図４Ａ】図４Ａは、組換え抗体作製に関するN5KG1ベクターの構造を示す。図中、Ｃはサイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサー、Ｂはウシ成長ホルモンポリアデニル化領域、Ｎ１はネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン１、Ｋはヒトイムノグロブリンκ定常領域、Ｇ１はヒトイムノグロブリンγ１定常領域、ＢＴはマウスβグロブリン主要プロモーター、Ｎ２はネオマイシンホスホトランスフェラーゼのエクソン２、Ｄはジヒドロ葉酸レダクターゼ、ＶＨは重鎖可変領域、ＶＬは軽鎖可変領域をそれぞれ表す。

【図４Ｂ】図４Ｂは、組換え抗体作製に関する、天然型のヒトイムノグロブリンと、IgG4PE，IgG4344，IgG4344h1，IgG4344uh，IgG4344uhmのＣＨ１領域とヒンジ領域（アッパーヒンジ及びミドルヒンジ）のアミノ酸配列を示す。

【図４Ｃ】図４Ｃ（すなわち、図4C-１～図4C-3）は、組換え抗体作製に関する、N5KG1_7-10，N5KG1_4-49発現ベクター作製工程図を示す。

【図４Ｄ】図４Ｄ（すなわち、図4D-１～図4D-3）は、組換え抗体作製に関する、N5KG1_6-4-50，N5KG1_6-5-2発現ベクター作製工程を示す。

【図４Ｅ】図４Ｅは、組換え抗体作製に関する、図示した各種改変重鎖の定常領域の配列を示す。

【図４Ｆ】図４Ｆ（すなわち、図4F-１～図4F-2）は、組換え抗体作製に関する、7-10G4344uhm重鎖の核酸およびアミノ酸配列を示す。

【図４Ｇ】図４Ｇは、組換え抗体作製に関する、7-10G4344uhm軽鎖の核酸およびアミノ酸配列を示す。

【図５】図５は、ヒンジ改変抗体の活性を示す。Ａ：UT7/TPO細胞増殖アッセイにおける4-49G1，4-49G3311，4-49G3331の活性。Ｂ：UT7/TPO細胞増殖アッセイにおける7-10G4344uhm，4-49G4344uhmの活性。

【図６Ａ】図６Ａは、シグナル伝達解析（実施例１１）における、アゴニスト抗体7-10G4344uhm，4-49G4344uhmのシグナル伝達解析結果を示す。

【図６Ｂ】図６Ｂは、シグナル伝達解析（実施例１１）における、アゴニスト抗体6-5-2G1，6-5-2G3344のシグナル伝達解析結果を示す。

【図７】図７は、ヒト血小板プライミング作用を示す。これは、実施例12記載の試験の結果を示す。アゴニスト抗体7-10G3311，4-49G3311によるヒト血小板プライミング作用が示された。また、アゴニスト抗体のみ（ADP非添加）では血小板の凝集は起こらないことが示された。

【図８】図８は、カニクイザルへのアゴニスト抗体投与による血小板数の変化を示したグラフである。実施例13に記載のように、カニクイザルにアゴニスト抗体を投与し、血小板数をモニターした。矢印は一回目（PEG-rHuMGDF）および二回目（アゴニスト抗体）の投与日を示す。

【図９Ａ】図９Ａは、NOG臍帯血移植モデルマウスにおいてCD34+細胞を1,000個（右図）又は10,000個（左図）を移植した後に被検物質を投与したときの末梢血ヒト血小板数の経時的推移を示す。図中、Preは投与前の血小板数を示す。

【図９Ｂ】図９Ｂは、NOG臍帯血移植モデルマウスにおいてCD34+細胞を1,000個（右図）又は10,000個（左図）を移植した後に被検物質を投与したときの、移植後６週における骨

髄ヒト前駆細胞数(colony count; GM+E+GEM)を示す。前駆細胞数は、巨核球系以外の合計細胞数であり、GMは顆粒球・マクロファージ系、Eは赤血球系、GEMはColony-forming-unit-granulocyte-macrophage-erythroidを表わす。結果は、平均±標準偏差(mean±SD)で表わしている。また、ベヒクル（Vehicle）はコントロールとしてのPBS（リン酸緩衝塩水）を表わし、また、NTは非処理(Non-treated)を表わす。

【図９Ｃ】図９Ｃは、NOG臍帯血移植モデルマウスにおいてCD34+細胞を1,000個（右図）又は10,000個（左図）を移植した後に被検物質を投与したときの、移植後６週における末梢血ヒト細胞キメラ率を示す。ベヒクル（Vehicle）は対照としてのPBS（リン酸緩衝塩水）を表わし、また、NTは非処理(Non-treated)を表わす。

【図１０】図１０は、ヒトMpl Tgマウスへのアゴニスト抗体投与後の血小板数の経日推移を示す。対照として、該TgマウスへのTPO又はベヒクル(PBS)の投与、並びに、非Tg（野生型；Non-Tg）マウスへの7-10G4344uhm（10μg）の投与実験を行い、その結果も示した。結果は、平均±SEMで表わした。

【図１１】図１１は、アゴニスト抗体7-10G4344uhmの軽鎖変異抗体のFM3A-hMpl細胞への結合性を示す。

【図１２】図１２は、アゴニスト抗体7-10G4344uhmの軽鎖変異抗体に関するUT-7/TPO細胞を用いた細胞増殖アッセイの結果を示す。

【配列表フリーテキスト】

【０２４０】

配列番号11：変異ヒンジドメインUH2G3uhm
配列番号12～16：プライマー
配列番号18～22：プライマー
配列番号39～54：プライマー
配列番号57～73：プライマー
配列番号74：G3344h1
配列番号75：G3344
配列番号76：G4344
配列番号77：G4344h1
配列番号78：G4344uh
配列番号79：G4344uhm
配列番号80：G4PE
配列番号81：7-10G4344uhm H鎖
配列番号82：7-10G4344uhm H鎖
配列番号83：7-10G4344uhm L鎖
配列番号84：7-10G4344uhm L鎖
配列番号85：7-10VL_V104L（変異体）
配列番号86：7-10VL_G100Q（変異体）
配列番号87：7-10VL_A43V（変異体）

【手続補正書】
【提出日】平成21年3月9日(2009.3.9)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体の定常領域が、以下の(1)又は(2)：
(1) ヒト抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列、或いは
(2) ヒト抗体サブクラス間で重鎖定常領域のドメインを入れ替えた重鎖定常領域のアミノ

酸配列、及び、ヒト抗体軽鎖定常領域のアミノ酸配列、
のいずれかのアミノ酸配列であって、該重鎖定常領域のヒンジ領域のアッパーヒンジ部の配列がELKTPLGDTTHT（配列番号10）であり、ミドルヒンジ部の配列がCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)x3、CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP若しくはCPRCPであり、CH1領域の配列がVDKRVを含み、及びCH2領域の配列がAPEFEGGP若しくはAPEFLGGPを含む、前記アミノ酸配列からなるか、あるいは該重鎖定常領域のヒンジ領域のアッパーヒンジ部の配列がESKTPLGDTTHT（配列番号11）であり、ミドルヒンジ部の配列がCPPCPであり、CH1領域の配列がVDKRVを含み、及びCH2領域の配列がAPEFEGGP若しくはAPEFLGGPを含む、前記アミノ酸配列からなり、且つ抗体の可変領域がヒトトロンボポエチン受容体に結合し該受容体を活性化する能力を有する、並びに、以下の(a)及び(b)：
(a) ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、10,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b) UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性が、そのN末端がペグ(PEG)化された配列番号１のアミノ酸配列からなる下記の構造：
PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH
を有するPEG-rHuMGDFの50%以上であり、且つ50％有効濃度（EC50）が100nM以下であること、
の性質を有する、ヒトトロンボポエチン受容体(c-Mpl)に対するアゴニスト抗体。
【請求項２】
以下の(a)及び(b)：
(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、1,000ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b)UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの70%以上であり、且つEC50が10nM以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
以下の(a)及び(b)：
(a)ヒト臍帯血CD34＋細胞を用いたCFU-MKコロニー形成測定法において、100ng/mL以下の濃度でコロニー形成を誘導すること、及び
(b)UT7/TPO細胞を用いた増殖能測定法において、最大活性がPEG-rHuMGDFの90%以上であり、かつEC50が1nM以下であること、
の性質を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
以下の(1)～(8):
(1) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(2) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号５で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(3) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号７で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(4) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号９で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(5) 配列番号２で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号３で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
(6) 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号５で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

(7) 配列番号６で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号７で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び
(8) 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９で示されるアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する、請求項１に記載の抗体。

【請求項５】

ヒトc-Mplに対するアゴニスト抗体がヒト抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体。

【請求項６】

以下の(1)～(8)：
(1) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号３のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(2) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号５のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(3) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(4) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(5) 配列番号２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(6) 配列番号４のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
(7) 配列番号６のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、及び
(8) 配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９のアミノ酸配列においてフレームワーク領域に１、２若しくは３個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体、
からなる群から選択される、請求項５に記載の抗体。

【請求項７】

請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項８】

請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板増多剤。

【請求項９】

骨髄移植又は臍帯血移植時の血小板回復促進用である、請求項８に記載の血小板増多剤。

【請求項１０】

請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む血小板減少症治療剤。

【請求項１１】

血小板減少症が、以下の(1)～(6)：
(1) 特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、
(2) 癌化学療法後の血小板減少症、
(3) 再生不良性貧血、
(4) 骨髄異形性症候群（MDS）、
(5) 肝疾患にともなう血小板減少症、及び

(6) 骨髄移植もしくは臍帯血移植後の血小板減少症、
からなる群から選択される疾患のいずれか１つである、請求項１０に記載の血小板減少症治療剤。
【請求項１２】
請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体を有効成分として含む、造血幹細胞移植後の血球回復促進用の血球増多剤。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P7/00*(2006.01)i, *A61P7/04*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)i, *C07K16/46*(2006.01)i, *C12N15/02*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JDream2), JMEDPlus(JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DENG, Bijia, et al., An agonist murine monoclonal antibody to the human c-Mpl receptor stimulates megakaryocytopoiesis., Blood. 1998, Vol.92, No.6, pages 1981-1988.	1-12
Y	DEBILI, Najet, et al., The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors., Blood. 1995, Vol.86, No.7, pages 2516-2525.	1-12
Y	Kazuhiro MOTOKI et al., "Hito Senshokutai Do'nyu Mouse o Mochiita Hito Kotai Sakusei to sono Rinsho Oyo", Igaku no Ayumi, 13 November, 2004 (13.11.04), Vol.211, No.7, pages 733 to 736	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 June, 2007 (08.06.07)	19 June, 2007 (19.06.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-512776 A (SmithKline Beecham Corp.), 08 May, 2002 (08.05.02), Full text & WO 1999/055369 A1 & EP 1073464 A1 & US 2002/0062009 A1 & EP 1073464 B1 & DE 69920897 E & ES 2230848 T3 & US 6936698 B2 & US 2005/0208625 A1 & DE 69920897 T2	1-12
A	WO 1999/010494 A2 (GENENTECH, INC.), 04 March, 1999 (04.03.99), & AU 1998-088312 A & EP 1009831 A2 & JP 2001-513999 A & US 6342220 B1 & AU 755822 B & AU 2003-201322 A1 & AU 2003-201322 B2	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056536

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056536

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) shall be fulfilled only when there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical feature" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). The determination of unity of inventions shall be made without regard to whether a group of inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim (PCT

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12

Remark on Protest

the ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/056536

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Rule 13.3).

Now, examination is made about the common feature among the inventions of claims 1, 13, 14, 15, 17, 18 and 19 which are independent claims.

The inventions of claims 14, 15, 17 and 18 relate to "specific DNA comprising a nucleotide sequence encoding a specific amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence depicted in a specific SEQ ID number and an amino acid sequence having a specific mutation in the amino acid sequence", wherein all of the amino acid sequences mentioned above appear to be only for a specific heavy-chain or a specific light-chain of an antibody. However, even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into the consideration, it is quite difficult to say that an antibody can certainly bind specifically to a specific antigen and exert a desired function or property merely by defining only a heavy-chain and a light-chain of the antibody. Therefore, the "specific DNA comprising a nucleotide sequence encoding a specific amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence depicted in a specific SEQ ID number and an amino acid sequence having a specific mutation in the amino acid sequence" recited in these claims does not shear any common chemical structure or function, but has such an only common feature that it is a kind of DNA. Since DNA is already known at the time of filing the present application, the common feature among the inventions of claims 14, 15, 17 and 18 "specific DNA comprising a nucleotide sequence encoding a specific amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence depicted in a specific SEQ ID number and an amino acid sequence having a specific mutation in the amino acid sequence" cannot be regarded as a "special technical feature" in the meaning within PCT Rule 13.2.

Therefore, the inventions of claims 1, 13, 14, 15, 17, 18 and 19 do not comply with the requirement of unity of invention.

According to the decision stated above, it is obvious that a group of inventions which are claimed as alternatives in the inventions of claims 14, 15, 17 and 18 cannot also be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. It is considered that claims 14, 15, 17 and 18 include different four, four, eight and eight DNA-related inventions, respectively.

In conclusion, the present application includes the following 27 inventions in total: (i) an invention relating to claim 1 and parts of claims 2-12 referring to claim 1; (ii) an invention relating to claim 13; (iii) four inventions relating to claim 14 which include four groups of inventions; (iv) four inventions relating to claim 15 and a part of claim 16 referring to claim 15 which include four groups of inventions; (v) eight inventions relating to claim 17 which include eight groups of inventions; (vi) eight inventions relating to claim 18 which include eight groups of inventions; and (vii) an invention relating to claim 19 and a part of claim 20 referring to claim 19.

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０５６５３６

Ａ． 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

Ｂ． 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDream2), JMEDPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq

Ｃ． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	DENG, Bijia, et al., An agonist murine monoclonal antibody to the human c-Mpl receptor stimulates megakaryocytopoiesis., Blood. 1998, Vol.92, No.6, pages 1981-1988.	1-12
Y	DEBILI, Najet, et al., The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors., Blood. 1995, Vol.86, No.7, pages 2516-2525.	1-12

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０８．０６．２００７	１９．０６．２００７

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	３５３５
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	清水 晋治		
	電話番号 ０３－３５８１－１１０１ 内線 ３４４８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００５年４月）

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０５６５３６

Ｃ（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	元木一宏 他，ヒト染色体導入マウスを用いたヒト抗体作製とその臨床応用，医学のあゆみ，２００４．１１．１３，第２１１巻，第７号，ｐ．７３３－７３６	1-12
Y	JP 2002-512776 A (スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション) 2002.05.08, 全文 & WO 1999/055369 A1 & EP 1073464 A1 & US 2002/0062009 A1 & EP 1073464 B1 & DE 69920897 E & ES 2230848 T3 & US 6936698 B2 & US 2005/0208625 A1 & DE 69920897 T2	1-12
A	WO 1999/010494 A2 (GENENTECH, INC.) 1999.03.04 & AU 1998-088312 A & EP 1009831 A2 & JP 2001-513999 A & US 6342220 B1 & AU 755822 B & AU 2003-201322 A1 & AU 2003-201322 B2	1-12

国際調査報告 | 国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０５６５３６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件（ＰＣＴ規則１３．１）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（ＰＣＴ規則１３．２）。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる（ＰＣＴ規則１３．３）。

（特別ページに続く）

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．☑ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲１－１２

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

独立請求項である請求の範囲１，１３，１４，１５，１７，１８，１９に係る発明に共通する事項について検討する。

ところで、請求の範囲１４，１５，１７，１８に係る発明は、「特定の配列番号で示されるアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列において特定の変異を含むアミノ酸配列からなる群から選択される特定のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む特定のＤＮＡ」であって、当該アミノ酸配列はいずれも特定の抗体の重鎖または軽鎖のみを意図するものであるところ、本願出願時の技術常識を参酌してみても、重鎖または軽鎖のみだけでは特定の抗原に対して必ず特異的に結合し、且つ、所望の機能や性質を発揮するとはとてもいえないから、当該請求の範囲に記載された「特定の配列番号で示されるアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列において特定の変異を含むアミノ酸配列からなる群から選択される特定のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む特定のＤＮＡ」は、共通の化学構造や機能を有するものではなく、単にＤＮＡであることにおいてのみ共通する。そして、本願出願時にはＤＮＡは周知であったのだから、請求の範囲１４，１５，１７，１８に記載された発明に共通する事項である「特定の配列番号で示されるアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列において特定の変異を含むアミノ酸配列からなる群から選択される特定のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む特定のＤＮＡ」は、ＰＣＴ規則１３．２における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

してみると、請求の範囲１，１３，１４，１５，１７，１８，１９に係る発明は、発明の単一性の要件を満たしていない。

さらに、上述の判断に従えば、請求の範囲１４，１５，１７，１８に係る発明において択一的に記載されているそれぞれの一群の発明についても、一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえないから、発明の単一性の要件を満たしていないことは明らかであって、請求の範囲１４，１５，１７，１８は、それぞれ、異なった４個、４個、８個、８個のＤＮＡに関する発明からなる発明群であると認める。

したがって、本願には、(i)請求の範囲１及びそれを引用する請求の範囲２－１２に係る１個の発明、(ii)請求の範囲１３に係る１個の発明、(iii)４個の発明群からなる請求の範囲１４に係る４個の発明、(iv)４個の発明群からなる請求の範囲１５及びそれを引用する請求の範囲１６に係る４個の発明、(v)８個の発明群からなる請求の範囲１７に係る８個の発明、(vi)８個の発明群からなる請求の範囲１８に係る８個の発明、(vii)請求の範囲１９及びそれを引用する請求の範囲２０に係る１個の発明、合計２７個の発明からなる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/08 (2006.01)	Ｃ１２Ｐ 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 片岡 之郎
東京都渋谷区神宮前六丁目２６番１号 キリンファーマ株式会社内
(72)発明者 吉田 英明
群馬県高崎市宮原町３番地 キリンファーマ株式会社 探索研究所内
(72)発明者 萩原 哲也
群馬県高崎市宮原町３番地 キリンファーマ株式会社 探索研究所内

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA07 DA02 EA04
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4C085 AA14 BB12 CC02 CC04 DD32 DD62
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA57 DA76 EA24 FA74

【要約の続き】
、並びに、その抗体を含む血小板減少症治療用医薬組成物を提供する。

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。